



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS- DCF
CURSO DE FARMÁCIA**

CINTHIA RODRIGUES MELO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in silico* E DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICAS, ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA *in vitro* DE
UM DERIVADO DAS QUINAZOLINONAS**

**JOÃO PESSOA- PARAÍBA
2018**

CINTHIA RODRIGUES MELO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in silico* E DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICAS, ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA *in vitro* DE
UM DERIVADO DAS QUINAZOLINONAS**

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Farmácia do Centro de Ciências da
Saúde, da Universidade Federal da Paraíba,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Farmácia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa

**JOÃO PESSOA- PARAÍBA
2018**

M528a Melo, Cinthia Rodrigues.

Avaliação da toxicidade in silico e das atividades citotóxicas, antioxidante e antibacteriana in vitro de um derivado das quinazolinonas / Cinthia Rodrigues Melo.

-- João Pessoa, 2018.

93p: il. -

Orientadora: Hilzeth de Luna Freire Pessoa.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Antibacteriana. 2. Antioxidante. 3. Quinazolinonas. Toxicidade. 6. Farmácia.

BS/CCS/UFPB

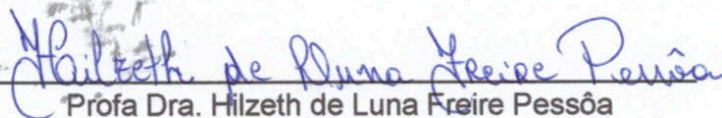
CDU: 615.281.9(043.2)

CINTHIA RODRIGUES MELO


**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in silico* E DAS ATIVIDADES CITOTÓXICAS,
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA *in vitro* DE UM DERIVADO DAS
QUINAZOLINONAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do Curso de
Farmácia da Universidade Federal da
Paraíba como pré-requisito para obtenção
do título de Farmacêutico.

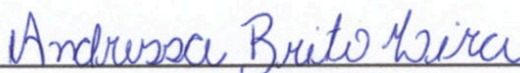
Aprovado em 23 de Januário de 20 18.



Profa Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
Orientadora - UFPB



Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
Examinador - UFPB



Ms. Andressa Brito Lira
Examinadora - UFPB

João Pessoa – PB
2018

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.”

(Isaiás 41:10)

Dedicatoria

“Dedico este trabalho a Deus e a minha família, em especial a minha avó Maria, mulher guerreira que até em seus últimos momentos me ensinou a enfrentar os desafios por mais difíceis que eles sejam.”

Agradecimientos

A *Deus*, por guiar os meus passos, por nunca me desamparar e me fazer entender e viver o seu amor soberano.

Aos meus pais, *António Rodrigues Melo* e *Francísca Regina Rodrigues Melo*, pela dedicação, apoio, amor e cuidado demonstrado todos os dias. Agradeço por acreditarem em mim, por toda confiança depositada, permitindo desde cedo que eu fosse em busca dos meus objetivos. Agradeço pela educação que me proporcionaram e por sempre me incentivar a vencer os desafios que a vida impõe.

Aos meus irmãos, *Yuri Rodrigues Melo* e *Yorran Rodrigues Melo*, pelo carinho e amor, por estarem sempre torcendo pelo meu melhor.

Aos meus tios, *Eva Luana*, *António Robson*, *Fátima Rodrigues*, *Aldenir Damasceno*, por estarem sempre presentes em minha vida torcendo por minhas conquistas.

Ao meu avô, *António Vilemar Lima* pelo carinho e por sempre desejar o meu bem.

A todos os demais *famíliares* que sempre estão me apoiando e manifestando carinho de alguma forma.

A minha irmã de coração, *Ana Beatriz Vieira Soares* por desde criança ser tão presente em minha vida e compartilhar vários momentos, por sempre manifestar carinho, e por ser uma pessoa na qual eu sei que sempre poderei ter como apoio.

A minha irmã em Cristo, *Natália Rodrigues de França* por sempre me ajudar a estar mais próxima de Deus. Agradeço por todo carinho e apoio ao longo dos anos.

Aos meus amigos que ao longo da vida foram se tornando importantes, me ajudando nos momentos difíceis, como também dividindo muitas alegrias: *Amanda Sampaio*, *Beatriz Lemos*, *Giselle Carlos*, *João Ronielly*, *Wilker Silva*, *Diego Cavalcante*, *Lidiane Caetano*, *Geovânia Caroline*, *Larissa Adilis*, *Severino Neto*, *Grasiela Costa*, *Fernanda Lacerda*, *Ana Luíza*, *Letícia Alves*, *Paulo Filho*.

A minha orientadora *Profa. Dra. Hílzeth de Luna Freire Pessoa*, por todo aprendizado. Também agradeço às *Profas. Dra. Margareth de Fátima F. Melo Díniz e Calíandra Maria Bezerra Luna Lima*, por todo apoio não apenas neste trabalho como durante toda graduação.

A todos os integrantes do *LABETOX*, pelo apoio e pelos ensinamentos repassados ao longo dos anos: Dr. Josué Ramalho, Luciana Ramalho, Kardilândia Mendes, Myrelle, Camila, Abrahão e em especial a Andressa Lira por sua dedicação em querer ajudar, e também agradeço minha colega de bancada Tafacla Dias por seu companheirismo.

Ao *Prof. Dr. Luís Cezar Rodrigues* e ao *Me. Cícero Anthonyelson Teixeira Dunes* do Laboratório de Síntese IPEFarm, por terem cedido a substância analisada no presente estudo.

Aos avaliadores deste trabalho, *Prof. Dr. Hemerson Yuri* e *Ma. Andressa Lira*, pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

A todos os *professores da UFPB*, pelos ensinamentos repassados, pela dedicação em formar profissionais de qualidade.

A todos que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Resumo e Abstract

Resumo

A síntese orgânica tem se tornado uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos fármacos. As substâncias derivadas da classe das quinazolinonas vem apresentando diferentes ações farmacológicas. O objetivo deste trabalho foi investigar a toxicidade *in silico* e as atividades hemolíticas, antioxidante e antibacteriana *in vitro* da substância C100. Para a avaliação da toxicidade teórica, foram utilizados dois programas computacionais, *Molinspiration* e *AdmetSAR*. Para os estudos de citotoxicidade, de potencial oxidante e de atividade antioxidante, foram utilizados eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, O e AB, e a substância foi testada nas concentrações de: 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL. O potencial oxidante e antioxidante foi avaliado na presença da fenilhidrazina (Ph) e de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs – H₂O₂). Por fim, foi estudada a atividade antibacteriana da substância C100 (nas concentrações 400, 200, 100, 50 e 25 µg/mL) frente às cepas Gram-negativas (*E. coli* ATCC 8539, *E. coli* 101, *E. coli* 2536) e Gram-positivas (*S. aureus*, ATCC 25619, *S. aureus* ATCC 25925 e *S. aureus* 47). De acordo com os resultados obtidos, a substância C100 apresenta boa biodisponibilidade e baixa toxicidade teórica. Não causou hemólise até a concentração de 100 µg/mL, foi capaz de reduzir o estresse osmótico para o tipo sanguíneo O, e não apresentou poder oxidante em nenhuma das concentrações estudadas. Entretanto apresentou atividade antioxidante frente a fenilhidrazina e ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Na avaliação antibacteriana não foi observada atividade para as cepas testadas. Assim, conclui-se que a substância C100 apresenta uma boa biodisponibilidade oral teórica, baixa citotoxicidade, tem ação antioxidante, foi capaz de proteger os eritrócitos do tipo sanguíneo O, contudo não apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias testadas. Sendo assim, a substância C100 requer maiores estudos, tendo em vista sua baixa citotoxicidade, o que demonstra que a mesma é uma molécula farmacologicamente promissora.

Palavras-Chaves: Antibacteriana; Antioxidante; Quinazolinonas; Toxicidade.

ABSTRACT

Organic synthesis has become a promising alternative for the development of new drugs. Substances derived from the quinazolinone class have been shown to have different pharmacological actions. The objective of this work was to investigate the *in silico* toxicity and the *in vitro* antioxidant and hemolytic activities of substance C100. For the theoretical toxicity evaluation, two computational programs, Molinspiration and AdmetSAR, were used. For the cytotoxicity, oxidation potential and antioxidant activity studies, human blood type A, B, O and AB erythrocytes were used and the substance was tested at concentrations of: 10, 50, 100, 250, 500 and 1000 µg / ml. The oxidative and antioxidant potential was evaluated in the presence of phenylhydrazine (Ph) and reactive oxygen species (EROs - H₂O₂). Finally, the antibacterial activity of C100 (at concentrations of 400, 200, 100, 50 and 25 µg / ml) against gram-negative strains (*E. coli* ATCC 8539, *E. coli* 101, *E. coli* 2536) and Gram-positive (*S. aureus*, ATCC 25619, *S. aureus* ATCC 25925 and *S. aureus* 47). According to the results obtained, substance C100 has good bioavailability and low theoretical toxicity. It did not cause hemolysis until the concentration of 100 µg / mL, it was able to reduce the osmotic stress for type O blood, and did not present oxidizing power in any of the studied concentrations. However, it presented antioxidant activity against phenylhydrazine and hydrogen peroxide (H₂O₂). In the antibacterial evaluation no activity was observed for the strains tested. Thus, it is concluded that the substance C100 has a good theoretical oral bioavailability, low cytotoxicity, has an antioxidant action, was able to protect the erythrocytes type O blood, however did not present antibacterial activity against the bacteria tested. Therefore, the C100 substance requires further studies in view of its low cytotoxicity, which demonstrates that it is a pharmacologically promising molecule.

Keywords: Antioxidant; Antibacterial; Quinazolinones; Toxicity;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química básica da quinazolinona.....	26
Figura 2- Estrutura química da 2- (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) -3-fenil-2,3-di- hidroquinazolin-4 (1H) –ona (C100).....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades moleculares da substância C100 calculadas no software <i>Molinspiration</i>	49
Tabela 2 – Predição de bioatividades, calculadas no software Molinspiration, para a substância C100.....	49
Tabela 3 – Propriedades de classificação ADMET, calculadas no software AdmetSAR, para a substância C100.....	51
Tabela 4 - Porcentagem de hemólise ocasionada pela substância C100 em eritrócitos humanos.....	52
Tabela 5 - Porcentagem de hemólise ocasionado pela substância C100 em eritrócitos humanos após tratamento com uma solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo A induzida pela C100.....	51
Gráfico 2: Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo AB induzida pela C100.....	52
Gráfico 3: Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo B induzida pela C100.....	53
Gráfico 4: Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo O induzida pela C100.....	54
Gráfico 5: Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos do tipo O induzida pela C100 quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	55
Gráfico 6: Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos do tipo A induzida pela C100 quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	55
Gráfico 7: Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos do tipo B induzida pela C100 quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	56
Gráfico 8: Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos do tipo AB, induzida pela C100 quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	57
Gráfico 9: Efeito oxidante da C100 em eritrócitos humanos do tipo O.....	58
Gráfico 10: Efeito antioxidante da C100 em eritrócitos humanos do tipo O.....	59
Gráfico 11: Atividade antioxidante da substância C100 frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo O.....	61
Gráfico 12: Atividade antioxidante da substância C100 frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo A.....	61
Gráfico 13: Atividade antioxidante da substância C100 frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo B.....	62
Gráfico 14: Atividade antioxidante da substância C100 frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo AB.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME - Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
ADMET- Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ATCC - American Type Culture Collection
BHI - Brain Heart Infusion
CAT – Catalase
CCT - Coleção de Culturas Tropicais
CCIH - Comissões de Controle de Infecções Hospitalares
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CLogP- Coeficiente de Partição
CompTox - Computational Toxicology Research
DNA – Ácido desoxiribonucleico
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
ESBL - Betalactamases de Espectro Ampliado
FDA - Food and Drug Administration
GPCR – Receptor acoplado à proteína G
GSH-Px – Glutathione peroxidase
GST – Glutathione S-Transferase
hERG – Human Ether -a-go-go- Related Gene
IC₅₀ - Concentração Inibitória 50
IPeFarM – Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IRAS - Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)
nALH - Número de aceptores de ligação de hidrogênio
nDLH - Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio
ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
RNA - Ácido Ribonucleico
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
SPE - Substâncias Poliméricas Extracelulares
SOD - Superóxido dismutase
TPSA – Topological Polar Surface Area

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

US-EPA- United States Environmental Protection Agency

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1 Produtos Naturais e Síntese Orgânica.....	24
2.2 Classe das Quinazolinonas.....	25
2.3 Avaliação Toxicológica.....	27
2.4 Estudo <i>in silico</i>	28
2.5 Citotoxicidade.....	30
2.6 Estresse oxidativo e potencial antioxidante.....	32
2.7 Atividade Antibacteriana.....	34
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Local da Pesquisa.....	40
4.2 Materiais.....	40
4.2.1 Substância C100.....	40
4.2.2 Eritrócitos Humanos.....	41
4.2.3 Espécies Bacterianas.....	41
4.2.4 Meio de Cultura.....	41
4.2.5 Preparação do Inóculo Bacteriano.....	41
4.3 Métodos.....	42
4.3.1 Ensaio <i>in silico</i>	42
4.3.1.1 <i>Molinspiration</i>	42
4.3.1.2 AdmetSAR.....	42
4.3.2 Ensaio de Citotoxicidade.....	43
4.3.2.1 Avaliação do potencial hemolítico da substância C100 em eritrócitos humanos.....	43
4.3.2.2 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença da substância C100	44
4.3.3 Ensaio de Atividade Oxidante e Antioxidante.....	44
4.3.3.1 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante da substância C100 em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina.....	44
4.3.3.2 Avaliação do potencial antioxidante da substância C100, em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio....	45
4.3.4 Atividade Antibacteriana.....	46
4.3.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	46
4.3.4.2 Análise Estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	48
5.1 Ensaio <i>in silico</i>	48
5.1.1 <i>Molinspiration</i>	48

5.1.2 AdmetSAR.....	49
5.2 Ensaios de Citotoxicidade.....	51
5.2.1 Avaliação do potencial hemolítico da substância C100 em eritrócitos humanos.....	51
5.2.2 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença da substância C100.....	54
5.3 Atividades Oxidante e Antioxidante.....	57
5.3.1 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante da substância C100, em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina.....	57
5.3.2 Avaliação do potencial antioxidante da substância C100 em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio.....	59
5.4 Atividade Antibacteriana.....	62
5.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	62
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÕES.....	75
8. REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS.....	93

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A síntese orgânica tem tido grande importância no desenvolvimento de novos fármacos, tornando-os mais seletivos aos alvos e proporcionando um melhor rendimento. Através de modificações moleculares é possível deixar o princípio ativo mais estável, e dessa forma apresentar melhor ação biológica (LEITE et al., 2015; MOURA et al., 2014).

Cada classe de compostos químicos apresenta suas peculiaridades, as quinazolinonas são encontradas em muitos produtos naturais, e apresentam diferentes atividades farmacológicas. Seus derivados sintéticos possuem atividades antibacterianas, anticancerígenas, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatórias e analgésicas (AL-AMIERY et al., 2014; ROSTAMI et al., 2017).

Devido a grande variedade farmacológica das quinazolinonas, é crescente o interesse na síntese de novas moléculas, como foi o caso da 2- (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) -3-fenil-2,3-di-hidroquinazolin-4 (1H)-ona, que foi o objeto deste estudo, sendo identificada como substância C100.

As substâncias podem apresentar potencial toxicológico, assim é necessário que toda molécula passe por estudos toxicológicos antes de ser administrada ao homem para evitar danos ao organismo. (CAMARGO et al., 2017; DE AZEVEDO, 2010). Ensaio de toxicidade se fazem necessários, assim como a investigação dos mecanismos de ação da droga, da forma como ela age no corpo e de que maneira ela pode estar interferindo com outras substâncias, além de caracterizar sua atividade biológica (ANDRADE et al., 2016; DUMONT et al., 2015).

Através de ensaios *in silico*, é possível por meio de modelos moleculares computacionais, fazer previsões da ação da molécula estudada (ANDRADE et al., 2016). Sendo uma ferramenta interessante para nortear o estudo de moléculas inéditas, como foi o caso da substância C100.

Já os estudos de citotoxicidade utilizando eritrócitos, permitem uma avaliação do potencial protetor ou não das membranas celulares quando um estresse osmótico é sofrido, bem como permitem uma investigação do potencial oxidante e antioxidante (YASMEEN, HASSNAIN 2016; ZOHRA,

FAWZIA, 2014). Durante a busca de novas drogas, a investigação antibacteriana também é relevante, uma vez que há uma grande resistência bacteriana a diversos fármacos, sendo importante a descoberta de novas moléculas com potencial bactericida ou bacteriostático (GASTALHO et al., 2014; NEHME et al., 2018).

Portanto, o seguinte estudo teve como objetivo, a investigação através de ensaios *in silico* da forma como a substância C100 age no organismo, e por meio de ensaios *in vitro* avaliar as atividades oxidante, antioxidante, hemolítica e anti-hemolítica, como também atividade antibacteriana.

Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produtos Naturais e Síntese Orgânica

Desde a pré-história é comum o uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças. Nesse período, o homem já conseguia distinguir quais plantas poderiam ser usadas como alimento, e quais tinham o poder de curar doenças. Entretanto, além dos benefícios trazidos, muitas destas causam toxicidade, o que exige um maior cuidado quanto ao seu consumo (FERREIRA, PINTO, 2010; MOTTA, 2016; SACHAN, GUPTA, 2015).

Com o tempo começou-se o desenvolvimento de técnicas de extração e isolamento dos princípios ativos das plantas, que são os responsáveis pela atividade farmacológica. Entretanto, uma das dificuldades de se usar um produto de origem natural como fármaco, é a obtenção em grandes quantidades da matéria prima, seja pelo custo ou pela escassez de fontes renováveis. Além do que, substâncias de origem natural muitas vezes apresentam problemas farmacocinéticos por sua baixa solubilidade, mesmo assim essa substância isolada poderá servir de modelo para síntese de novos candidatos aos fármacos (BRANDÃO et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2010; FERREIRA, PINTO, 2010).

Dessa forma a síntese de fármacos inéditos e com maior eficácia, ganharam bastante evidência. Com o desenvolvimento de diferentes métodos de síntese, houve um maior rendimento para a produção de novos princípios ativos, além de tornar estes mais específicos. As modificações moleculares possibilitam uma melhor seletividade ao seu alvo celular, além de aperfeiçoar a estabilidade da substância, de acordo com os parâmetros físico-químicos e biológicos (LEITE et al., 2015; MOURA et al., 2014).

O conhecimento científico da síntese química de moléculas orgânicas associado às suas propriedades farmacológicas, propiciaram ao longo do século XX maior avanço na busca por medicamentos por parte da indústria farmacêutica (LIMA, CAVALCANTI FILHO, 2007). Um exemplo foi a planta *Salix alba* que isolaram a salicilina, que apresenta propriedades analgésicas e

antitérmicas, e através de modificações moleculares originou-se o ácido salicílico. Em 1897 Felix Hoffman sintetiza o ácido acetilsalicílico dando início a era dos fármacos sintéticos (CALIXTO, JÚNIOR SIQUEIRA, 2008; DOS SANTOS 2015).

No Brasil, com a implantação da Lei de Patentes em 1996 e da Lei do Medicamento Genérico em 1999, a indústria farmacêutica brasileira passou por mudanças, que impulsionaram a reestruturação de estratégias tecnológicas, intensificando a pesquisa e desenvolvimento (P&D) no país. Uma das respostas a essas mudanças, foi a criação por uma empresa farmacêutica da primeira molécula sintética inovadora. Que deu origem ao Helleve, que é um medicamento para tratamento de disfunção erétil (DOS SANTOS, FERREIRA, 2012; PINTO, BARREIRO, 2013; SANTOS, PINHO, 2012).

Ainda no início do século XX as drogas desenvolvidas não tinham base científica de sua eficácia e segurança toxicológica, a maioria eram derivadas de plantas, sendo poucas de origem sintética (ANDRADE et al., 2016). Hoje, a síntese orgânica é a forma mais promissora para a obtenção de novos medicamentos. Através da preparação de estruturas que apresentem grupos farmacofóricos e assim sejam biologicamente ativos, direcionando para o seu alvo farmacológico (BREL et al., 2015).

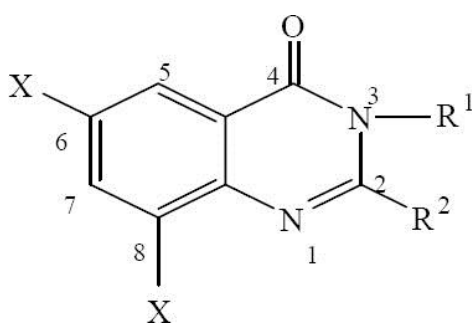
2.2 Classe das Quinazolinonas

As quinazolinonas são uma classe de compostos heterocíclicos (Figura 1), encontrados em muitos produtos naturais, apresentando uma grande variedade de compostos biologicamente e farmacologicamente ativos (ROSTAMI et al., 2017). As substâncias da classe das quinazolinona são alcaloides e apresentam consideráveis atividades farmacológicas, sendo promissoras para o desenvolvimento de medicamentos. Derivados sintéticos dessa classe apresentam atividades antibacterianas, anticancerígenas, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatórias e analgésicas (AL-AMIERY et al., 2014; SINGH, 2015; VIJAYAKUMAR et al., 2013).

Quanto a atividade antibacteriana, estudos mostram que alguns derivados

de quinazolinona apresentaram boa ação especialmente contra cepas Gram-positivas, agindo sobre a parede celular e o DNA destas (MOHAMED et al., 2013).

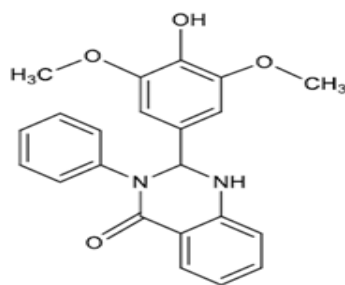
Ao se realizar algumas substituições na estrutura das quinazolinona, atividades antimicrobianas são melhoradas, como nas posições 2 e 3 e a existência de halogênios nas posições 6 e 8. Também foi observado que a presença de anel aromático substituído na posição 3 e os grupos metilo, amina ou tiol na posição 2 são importantes para que se apresente atividades antimicrobianas (JAFARI, 2016; ZAYED, HASSAN, 2014).



Fonte: Jafari et al, 2016

Figura 1: Estrutura química básica da quinazolinona

Foi sintetizado uma molécula inédita pertencente a classe das quinazolinonas, a 2- (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) -3-fenil-2,3-di-hidroquinazolin-4 (1H) -ona. Para a identificação mundial comum, as substâncias recebem a nomenclatura IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), que facilita assim a identificação das espécies químicas através de palavras escritas ou pronunciadas (RODRIGUES, 2011). Mas para melhor entendimento no presente trabalho, ela foi denominada como C100, e sua estrutura pode ser observada na Figura 2.



Molécula "C100" 225MG
Massa molar: 376,41 g/mol

Fonte: Dados da autora, 2018

Figura 2: Estrutura química 2- (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) -3-fenil-2,3-di-hidroquinazolin-4 (1H) –ona (C100).

2.3 Avaliação Toxicológica

A toxicologia é a ciência voltada para a compreensão dos possíveis efeitos adversos causados por uma substância quando esta interage com o organismo vivo, ou com sistemas biológicos. É responsável por investigar as propriedades físico-químicas, a forma como tais substâncias agem, além de analisar sua concentração e sob quais condições ela poderá causar danos. Não consiste em uma ciência meramente descritiva e analítica, mas também experimental. Portanto, toda e qualquer substância, antes de ter contato com o ser humano deve previamente passar por um estudo toxicológico (CAMARGO et al., 2017; DE AZEVEDO, 2010; DOS SANTOS 2015; FUKUSHIMA, DE AZEVEDO, 2008).

O estudo toxicológico é crucial na avaliação do potencial lesivo que uma substância é capaz de causar às células (MARREIRO et al., 2014). Estudos de toxicidade são importantes na investigação preliminar da ação de determinada substância, pois além de direcionar o estudo, diminui o uso de animais na experimentação (OLIVEIRA et al., 2015).

O conhecimento químico da droga e de qualquer outro xenobiótico que venha ser administrado ao ser humano, deve ser estudado minuciosamente. Justamente para evitar incidentes como o caso da Talidomida, que ficou mundialmente conhecido por ter causado malformação congênita ao ser

ingerido por grávidas no intuito de controlar sintomas de êmese, sendo este um marco na toxicologia moderna (CAMARGO et al., 2017).

Portanto, é importante o conhecimento dos mecanismos de absorção, excreção, concentração no tecido e possíveis interações com outras substâncias e alimentos (ANDRADE et al., 2016; DUMONT et al., 2015).

2.4 Estudo *In silico*

A melhor compreensão das estruturas moleculares através de modelos computacionais, permitiu maior avanço sobre seus conhecimentos funcionais, tendo assim avanços na área farmacológica (VIEIRA, 2015). A construção de uma modelagem molecular otimizada, é baseado em um modelo teórico, sendo a conformação estrutural importante para o ajuste correto do ligante ao seu sítio correto de ligação (RIBEIRO, 2017).

Ensaio *in silico* são testes realizados em computadores, no qual através de modelos moleculares computacionais, é possível fazer previsões da ação da molécula estudada em testes *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in silico* tem como principais vantagens o baixo custo, a velocidade de execução e a diminuição do número de animais usados nos testes *in vivo*. Sendo assim, uma boa alternativa para descobrir novas drogas com atividade farmacológica. Através dos modelos computacionais é possível fazer o estudo da estrutura atividade, da toxicologia e estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ANDRADE et al., 2016; EKINS, 2007).

O estudo *in silico* de uma molécula envolve os conceitos de relação Estrutura-Atividade [(Q)SAR] e sistemas inteligentes. No qual SAR refere-se a um modelo qualitativo que informa sobre o potencial da atividade biológica. Já um QSAR é um modelo quantitativo, que relaciona a resposta biológica com as propriedades físico-químicas e estruturais, sendo possível observar a ligação a um receptor e ao DNA, entre outras estruturas. Os sistemas inteligentes predizem a estrutura molecular e sua possível atividade biológica (BENFENATI et al., 2017; SANTOS, PINHO, 2012; VICTAL et al., 2014).

Os estudos QSAR são importantes na orientação da síntese de novos

compostos ativos, podendo otimizar suas propriedades, prevendo sua possível atividade biológica e mecanismo de ação. Para o desenvolvimento de um modelo são utilizadas variáveis dependentes e independentes. As ditas dependentes, ou variável resposta, refere-se a ação biológica da molécula (por exemplo, IC_{50} — que é a dose necessária para inibir um determinado processo biológico ou atividade enzimática em 50%). Quanto as variáveis independentes, ou descritores moleculares, retratam as propriedades químicas e estruturais dos compostos (GERTRUDES et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012).

Utilizando ferramentas *in silico*, é possível prever a toxicidade de substâncias químicas. Sendo um instrumento útil para a toxicologia na abordagem molecular, através da avaliação das propriedades estruturais e físico-químicas pode-se averiguar os prováveis riscos que a substância traz (BENFENATI et al., 2017).

Foi desenvolvido nos Estados Unidos um programa de pesquisa em toxicologia computacional intitulado de *Computational Toxicology Research (CompTox)*. No qual através de bancos de dados, são avaliados os riscos de uma substância química, sendo possível assim diminuir o número de animais em testes, e reduzir os custos de estudo do potencial de toxicidade de uma substância (US-EPA, 2018).

Através de programas computacionais também é possível realizar estudos farmacocinéticos. O *admet-SAR* consiste em um banco de dados no qual realiza uma compilação molecular entre a estrutura química e o nome comum, nome IUPAC ou similaridade de estrutura. Permitindo assim a avaliação das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) das substâncias estudadas (CHENG et al., 2012; PARAMASHIVAM et al., 2015; TALUKADAR et al., 2017).

A ferramenta *Molinspiration* analisa os descritores moleculares e as propriedades dos compostos de drogas baseado na Regra dos Cinco de Lipinski (2001). Na qual afirma que as moléculas que descumprirem uma das regras podem ter problemas com biodisponibilidade. Sendo assim, devem ter coeficiente de partição octanol/água calculado ($cLogP$) ≤ 5 ; peso molecular \leq

500; número de aceptores de ligação de hidrogênio (nALH) ≤ 10 e número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH) ≤ 5 . Através dessa ferramenta também é possível prever a bioatividade para os alvos de fármaco mais importantes como ligantes GPCR, moduladores de canais iônicos, inibidores de quinase, enzimas e receptores nucleares (PARAMASHIVAM et al., 2015).

2.5 Citotoxicidade

Os eritrócitos são componentes majoritários na corrente sanguínea, sendo produzidos na medula óssea através do processo de eritropoiese, começando como células tronco e se diferenciando até chegar ao último estágio de maturação (OLIVEIRA, SALDANHA, 2010).

A principal função dos eritrócitos consiste no transporte de oxigênio e nutrientes para as células, e na retirada de dióxido de carbono e resíduos provenientes de reações celulares. Para que ocorra tal ação, as células vermelhas dispõem de uma proteína essencial, a hemoglobina. Esta é rica em ferro, e além de transportar oxigênio, também é responsável pela coloração avermelhada do sangue. O tempo de vida médio das células vermelhas é 120 dias, estas ao envelhecerem vão perdendo assimetria dos fosfolipídios de sua membrana, sofrem desidratação, aumento da densidade celular e do estresse oxidativo. Sendo então fagocitadas por macrófagos residentes (ROMERO, HERNÁNDEZ-CHINEA, 2017).

Devido a sua fácil disponibilidade, semelhança com outros tipos celulares e baixa variabilidade biológica, os eritrócitos são muito utilizados para estudos de citotoxicidade. Estas são células anucleadas com formato discoide e estrutura bicôncava, permitindo assim uma maior área de contato, o que facilita as trocas gasosas bem como sua flexibilidade, que está relacionado com a fluidez de sua membrana e resistência (MONTEIRO et al., 2015; RODI et al., 2014; SMITH et al., 2007; VOET, VOET 2013).

A membrana dos eritrócitos, ou células vermelhas é constituída por uma dupla camada de fosfolipídios, colesterol, proteínas e glicoproteínas. Servindo

como modelo para estudo de estabilidade, e ao sofrer lise liberam hemoglobina, que pode ser facilmente quantificada por espectrofotometria (MASCARENHAS NETTO et al., 2014; ZOHRA, FAWZIA, 2014).

Os lipídios que compõem a membrana eritrocitária, são sensíveis à oxidação e somando-se a presença de ferro e oxigênio se tem a formação de radicais livres (MACHADO et al., 2009). Os eritrócitos ao sofrerem lise, liberam a hemoglobina, e esta quando livre no plasma é prejudicial à saúde, podendo causar danos aos rins, fígado e coração (OLIVEIRA et al., 2015). O oxigênio que estava sendo carregado pela hemoglobina atua como oxidante, formando radicais livres como superóxido e o peróxido de hidrogênio, que ao combinar-se com o ferro, forma o radical hidroxila e este é altamente reativo (MACHADO et al., 2009).

Uma outra forma de observar os efeitos citotóxicos dos compostos, é por meio da avaliação da fragilidade osmótica, que consiste na sensibilidade da membrana eritrocitária em sofrer lise ao ser submetida a uma alteração de pressão osmótica. Podendo assim através da quantificação de hemoglobina liberada, ser avaliado a capacidade de uma substância em proteger os eritrócitos quando expostos a um estresse osmótico. (YASMEEN, HASSNAIN 2016; ZOHRA, FAWZIA, 2014). Assim como existem substâncias protetoras, também encontra-se aquelas que possuem ação direta na formação de radicais livres e espécies reativas não radicalares, gerando uma ação hemolítica sendo assim comprometedor para o organismo, como o aumento de potássio extracelular, podendo levar a uma parada cardíaca (CARVALHO et al., 2007; MANENTE et al., 2011).

2.6 Estresse oxidativo e potencial antioxidante

O estresse oxidativo ocorre devido um desbalanço entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estes podem ser radicais livres ou não como o peróxido de hidrogênio, sendo formados por substâncias endógenas ou exógenas (HARRISON et al., 2005; NICCO, BATTEUX, 2018).

As espécies reativas apresentam funções importantes no organismo, estando envolvidas em respostas mitogênicas, transdução de sinal, reconhecimento

intercelular e resposta imune contra infecções. Entretanto, quando em excesso causam ações nocivas, como aumento da peroxidação lipídica das membranas, aumento da carbonilação de proteínas, podendo causar danos até mesmo ao DNA (ruptura das fitas, ligação covalente) (HARRISON et al., 2005; NICCO, BATTEUX, 2018).

O organismo dispõe naturalmente de mecanismos de defesa antioxidante que agem na detoxificação das EROs. Enzimas antioxidantes como a catalase e a glutathione peroxidase, formam sistemas de defesa das células para interceptar os radicais livres, diminuindo os efeitos nocivos das EROs (DEAVALL et al., 2012; VEGA-RODRIGUÉZ et al., 2015).

O processo inflamatório está intimamente relacionado com o estresse oxidativo, já que células fagocíticas como os leucócitos são ativados e mobilizados para o local da inflamação, na qual ocorrerá eliminação dos patógenos agindo por mecanismos dependentes de oxigênio. Sendo assim, o aumento de oxigênio leva a produção de EROs. São formados radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), que rapidamente são convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de forma espontânea ou através da enzima superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio então, ao reagir com metais de transição pode formar o radical hidroxila (HO^{\bullet}), radicais peróxido (ROO^{\bullet}), o ânion peróxido nitrito ($ONOO^-$), óxido nítrico (NO) e ácido hipocloroso (HOCl). Sendo assim, o excesso de radicais livres pode ser altamente tóxico para as células e os tecidos (BELLÓ et al., 2015; CASCÃO et al., 2009).

As EROs são produzidas fisiologicamente, através de processos metabólicos e da cadeia transportadora de elétrons. A mitocôndria é a principal fonte de EROs, devido possuir muitos centros redox que transferem um elétron da molécula de oxigênio para formar o ânion superóxido. Para contrabalancear, o organismo possui enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a catalase (CAT). Na qual esta segunda é capaz de reduzir o H_2O_2 e peróxidos lipídicos a lipídios alcoólicos (CAMPANELLA et al., 2014; DE GROOT et al., 2012; SOARES et al., 2015).

A SOD além de causar a dismutação do ânion superóxido, em associação com a CAT e GSH-Px evitam concentrações crescentes de H_2O_2 . A

glutathione S-transferase (GST) e peroxidases também podem converter H_2O_2 em H_2O . Além destas enzimas, a tioredoxina através da formação de pontes de dissulfeto entre os resíduos de cistina de outras proteínas, facilitam a redução destas. Existem também outros sistemas antioxidantes, como os não-enzimáticos de baixo peso molecular como vitaminas A, C e E, polifenóis, glutathione e coenzima Q10 (MAO et al., 2017; NICCO, BATTEUX, 2018).

Os radicais livres podem agir sob ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas e organelas celulares, causando assim a peroxidação lipídica (que pode induzir apoptose por permeabilização das membranas mitocondriais) e oxidação de proteínas modificando a sinalização intracelular (CAMPANELLA et al., 2014; YU et al., 2016).

A bicamada lipídica da membrana celular ao sofrer oxidação diminui sua fluidez, fica incapaz de manter o gradiente iônico, além de perder sua seletividade, o que permite a entrada de substâncias tóxicas na célula (COQUEIRO et al., 2017).

Em excesso as EROs causam danos intracelulares, como ao ácido ribonucleico (RNA), levando a desregulação da síntese de proteínas e alterações gênicas. Também podem danificar o ácido desoxirribonucleico (DNA) causando mutação gênica, instabilidade cromossômica e aumento celular (KLAUNIG et al., 2010).

Além das espécies reativas de oxigênio, outras moléculas podem desencadear potentes efeitos oxidantes, como as espécies reativas de nitrogênio (ERN), através da reação entre o NO e O_2 , ($NO \cdot + O_2 \cdot \rightarrow ONOO$). Estes apresentam importância biológica nos sistemas cardiovasculares e neurológicos, além de causarem fragmentação do DNA e oxidação de lipídios (GHOSH et al., 2012; VALKO et al., 2016).

2.7 Atividade Antibacteriana

As espécies bacterianas são divididas em dois grandes grupos, Gram-positivas e Gram-negativas, que podem ser diferenciados por suas peculiaridades na parede celular, através da coloração de Gram (MADIGAN et al., 2016). Em 1884, Hans Christian Gram desenvolveu uma técnica de

coloração na qual verifica a capacidade das células coradas resistirem à descoloração pelo álcool. E assim permitiu diferenciar as bactérias em Gram-positivas (+) que se coram de roxo, e Gram-negativas (-) que ficam com coloração vermelha.

A parede celular das bactérias Gram positivas é bastante espessa, porém simples. Sendo constituída principalmente de peptidoglicano, polímeros ácidos, proteínas e polissacarídeos. Já em bactérias Gram-negativas a parede celular é bastante complexa, e é formada por várias camadas. Sendo a maior parte composta por uma membrana externa, que contém polissacarídeos, fosfolípidios (formando uma camada lipopolissacáridica ou LPS) e proteínas (TORTORA et al., 2012).

As bactérias Gram-negativas são as que mais adquirem resistência. Estas apresentam uma membrana externa que serve como uma barreira altamente impermeável, o que aumenta a dificuldade para lidar com essas espécies (GONZÁLEZ et al., 2018). Elas causam as infecções mais comuns: pneumonia, infecções do trato urinário, infecções do sítio cirúrgico e infecções de corrente sanguínea (ANVISA 2015).

Antibacterianos consistem em drogas com capacidade de agir de alguma forma sobre as bactérias. Apresentam diferentes mecanismos de ação, que podem inibir o crescimento bacteriano (bacteriostático) ou até mesmo mata-las (bactericidas) (FRIERI et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2017).

As infecções bacterianas começaram a ser combatidas por volta de 1940 com a descoberta das Sulfonamidas. Mas foi com a descoberta da Penicilina por volta de 1945 que a guerra contra as bactérias alavancou. Entretanto, a cada novo antimicrobiano originado tem sido seguido de resistência bacteriana (MOLTON et al., 2013).

Em 1980 surgiram as cefalosporinas de amplo espectro, mas cinco anos depois já foi registrado a presença de betalactamases de espectro ampliado (ESBL) em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. E com o passar do tempo, a resistência foi aumentando, iniciando principalmente nos hospitais (LIVERMORE, 2012). O que mostra a importância de se ter cada vez mais atuante nos hospitais Comissões de Controle de Infecções Hospitalares

(CCIH) (LINARDI et al., 2014).

De acordo com o Ministério da Saúde, mais de 70% das bactérias que causam Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde (IRAS) no Brasil, são resistentes no mínimo a um dos antibacterianos utilizados para o tratamento dos pacientes (ANVISA 2015).

Os antibacterianos apresentam diferentes mecanismos de ação: inibindo a síntese de ácidos nucleicos, modificando moléculas de proteínas e ácidos nucleicos, além de atuar na parede celular alterando sua permeabilidade (HENDRA et al., 2011).

A antibioticoterapia tem se tornado cada vez mais limitada, devido a crescente resistência bacteriana, como também pelos efeitos colaterais trazidos por estes medicamentos (WYPIJ et al., 2018). A resistência bacteriana se deve principalmente pelo uso irracional de antibióticos e falta de aderência ao tratamento correto. Mas um outro fator que tem chamado atenção é o uso excessivo de antibacterianos em animais, que conduz à resistência bacteriana. Podendo ser transmitido ao homem de forma indireta (GASTALHO et al., 2014; NEHME et al., 2018).

Clinicamente, as cepas ditas resistentes são aquelas que conseguem sobreviver numa terapia antimicrobiana no qual normalmente é usada, e é capaz de debelar o processo infeccioso. Essa resistência pode ser ocasionada por mutações (de forma natural ou agentes mutagênicos), ou transferência horizontal dos genes (DAVIES, DAVIES 2010; PITONDO-SILVA et al., 2014).

A resistência pode ser dita simples, quando o microorganismo é resistente a uma só droga; múltipla, quando apresenta resistência simultânea a uma ou mais drogas e resistência cruzada, quando o mecanismo bioquímico de resistência a uma droga é o mesmo para outras (DO NASCIMENTO, 2016).

Existem várias linhas de pesquisa para a busca de tratamentos mais eficazes contra as doenças bacterianas, estas que são uma das principais causas de morbidades em pacientes. O que justifica a busca por novos tratamentos biocompatíveis e mais eficientes. Pesquisadores tem desenvolvido moléculas sintéticas e semi-sintéticas na busca de novos alvos bacterianos e que venham superar os mecanismos de resistência das bactérias (NEHME et

al., 2018; WYPIJ et al., 2018).

Um outro grande problema que tem surgido, são os biofilmes, que consistem em comunidades bacterianas que se aderem à superfície de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), este é composto por substâncias que propiciam o crescimento bacteriano (HASAN et al., 2018).

A formação de biofilmes indicam grande risco de contaminação e apresentam grande resistência aos antibióticos, principalmente aquelas comunidades bacterianas já maduras. A junção entre a multiresistência e o surgimento do biofilme, resulta em infecções quase intratáveis com os antibióticos hoje disponíveis. O óxido nítrico (NO) é um agente antimicrobiano natural, capaz de mediar a dispersão do biofilme, sendo importante para o estudo de anti-biofilmes (GONZÁLEZ 2018;.HASAN et al., 2018).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade *in silico* e as atividades citotóxicas, antioxidante e antibacteriana *in vitro* de um derivado das Quinazolinonas, o 2- (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) -3-fenil-2,3-di-hidroquinazolin-4 (1H) -ona (C100).

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar as características molecular, farmacocinéticas e toxicológicas teóricas utilizando uma abordagem *in silico*.
- Avaliar a citototoxicidade sobre eritrócitos humanos oriundos de sangue dos tipos A, B, O e AB utilizando os modelos de hemólise e fragilidade osmótica eritrocitária.
- Investigar o perfil oxidante e antioxidante na presença de espécies reativas de oxigênio e do agente oxidante fenilhidrazina.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às linhagens bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas de importância clínica.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

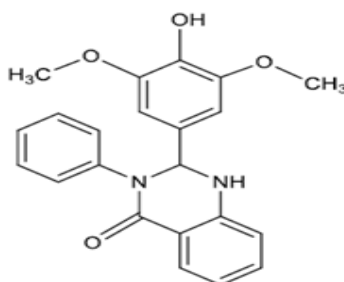
4.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Ensaio Toxicológicos II (LABETOX II), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), coordenado pelas Prof^a. Dr^a. Hilzeth de Luna Freire Pessôa. Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, e Prof^a. Dr^a. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima.

4.2 Materiais

4.2.1 Substância C100

A substância foi gentilmente cedida pelo Me. Cícero Anthonyelson Teixeira Dunes, aluno do Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues do Laboratório de Síntese IPeFarM.



Molécula "C100" 225MG
Massa molar: 376,41 g/mol

Fonte: Dados da autora, 2018

Figura 5: Molécula C100

- Nomenclatura IUPAC: 2- (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) -3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4 (1H) -ona
- Estado físico: sólido
- Rendimento de reação: 0,75 g (70,34%)
- Ponto de fusão: 212°C
- Índice de Retenção: 0,3 (em eluente de 6:4 de AcOEt/hexano)

A solução mãe foi preparada na concentração de 10mg/mL, utilizando o DMSO na concentração de 5%. Apartir desta foram obtidas as concentrações de teste 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg /mL.

4.2.2 Eritrócitos Humanos

Todos os eritrócitos humanos usados no presente estudo, foram provenientes de bolsas de descarte, obtidos na Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. Na qual continham concentrado de hemácias dos tipos sanguíneos A, B, O e AB. A manipulação e o descarte dos eritrócitos seguiram as Normas de Segurança padronizadas pela referida Unidade.

Para realização deste trabalho, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba, com o referido número de aprovação nº 1.658.669 (ANEXO A).

4.2.3 Espécies Bacterianas

Foram avaliadas tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas oriundas da Coleção de Culturas Tropicais (CCT), *American Type Culture Collection* (ATCC) e de origem clínica, sendo elas:

- *Escherichia coli* ATCC 8539
- *Escherichia coli* 101
- *Escherichia coli* 2536
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25619
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25925
- *Staphylococcus aureus* 47

4.2.4 Meio de Cultura

As bactérias foram cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) preparado de acordo com as instruções do fabricante e esterilizados em autoclave, a 121 °C por 15 minutos. Para a obtenção do meio de cultura sólido, adicionou-se ágar 1,5 %.

4.2.5 Preparação do inóculo bacteriano

As bactérias foram inoculadas em meio BHI e incubados a 37 °C durante 24 h. Colônias foram suspensas em BHI e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, contendo $1-5 \times 10^8$ UFC/mL (CLEELAND, SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000).

4.3 Métodos

4.3.1. Ensaios *in silico*

4.3.1.1 *Molinspiration*

As propriedades moleculares foram calculadas, com base em descritores moleculares utilizando a regra dos cinco de Lipinski, no software *Molinspiration Online Property Calculation Toolkit* (www.molinspiration.com/). A investigação de Lipinski e colaboradores deu origem a chamada “regra dos 5”, que traçou um perfil para moléculas de fármacos dentro de limites de massa molar, lipofilia que é representada pelo coeficiente de partição, log P, e hidrofilia, representada pelo número de doadores e receptores de ligação de hidrogênio. A regra dos cinco estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral. Esta biodisponibilidade está associada à absorção e a permeabilidade de possíveis fármacos e depende de cinco parâmetros: (a) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (b) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (c) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol; (d) coeficiente de partição octanol-água (milog P) menor ou igual a 5; (e) área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å. Moléculas que não atendem mais do que um destes parâmetros podem ter problemas com a biodisponibilidade (SILVA, 2015).

4.3.1.2 AdmetSAR

Os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos teóricos (ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) foram calculados com o objetivo de analisar se a substância C100 possui as

características essenciais para que possa ser considerada como possível fármaco. Alguns parâmetros relacionados à absorção, toxicidade e metabolização foram avaliados pela ferramenta admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>) (SOUZA, 2015). Esses parâmetros são permeabilidade na barreira hematoencefálica, permeabilidade Caco-2, absorção no intestino, se são substratos e inibidores das enzimas do complexo citocromo e se são inibidores de transporte renal de cátions. Através desta ferramenta foi avaliada a metabolização utilizando algumas enzimas do complexo citocromo P450, comparando se os compostos são substratos para os citocromos CYP450 2D6, CYP450 3A4, CYP450 2C9, se são inibidores dos citocromos CYP450 1A2, CYP450 2C9, CYP450 2D6, CYP450 2C19, CYP450 3A4 assim como a promiscuidade de inibição dos citocromos.

4.3.2 Ensaios de Citotoxicidade

4.3.2.1 Avaliação do potencial hemolítico da substância C100 em eritrócitos humanos

Para obtenção dos eritrócitos, inicialmente foi realizado a lavagem de uma amostra de sangue humano com NaCl 0,9 % e centrifugado a 2500 rpm durante 5 minutos, sendo este procedimento realizado três vezes. Após a última lavagem, foram retirados 500 µL do sedimento e ressuspenso em 100 mL de NaCl 0,9%, resultando em uma solução a 0,5%. Sendo em seguida distribuídos 2mL desta solução em eppendorfs, juntamente com a substância nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL. O grupo controle negativo consistiram em tubos contendo apenas a solução de eritrócitos (0 % de hemólise) e uma solução de eritrócitos acrescida de Triton X-100a 1% (agente hemolizante) como controle positivo (100 % de hemólise). Sendo então todos os grupos testes incubados por 1 hora a 25 ± 2 °C sob agitação lenta e constante (100 rpm). Após esse período, realizou-se a centrifugação a 2500 rpm durante 5 minutos, sendo em seguida feito a quantificação da hemólise através da leitura de uma alíquota do sobrenadante por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al., 1997). Os experimentos

foram realizados em triplicata e o resultado expresso em comparação ao controle positivo.

4.3.2.2 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença da substância C100

Foram distribuídos em tubos 2 mL de uma suspensão de eritrócitos a 0,5%, seguido da substância C100 nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL, e incubado por 1 hora a 25 ± 2 °C sob agitação lenta e constante de 100 rpm. Após esse período, as preparações foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante, descartado. Os eritrócitos foram então ressuspensos em uma solução hipotônica de cloreto de sódio (0,24 %) e agitadas a 100 rpm, por 20 minutos a 25 ± 2 °C. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria com comprimento de onda de 540 nm (DACIE, LEWUIS, 2001).

Como controle negativo foi utilizada uma solução de eritrócitos (0 % de hemólise) e uma suspensão de eritrócitos apenas com a presença da solução de cloreto de sódio a 0,24 % como controle positivo (100 % de hemólise). Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso em comparação ao controle positivo.

4.3.3 Ensaios de Atividade Oxidante e Antioxidante

4.3.3.1 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante da substância C100 em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina

Para analisar o potencial oxidante foi preparada uma solução de eritrócitos a 30 % em PBS (11,35 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 24,36 g Na_2HPO_4 e 7,18 g NaCl para 1 L; pH 7,4) suplementado com glicose (200 mg/dL), pH 7,6. Em seguida, a substância estudada nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL foram adicionadas a 2 mL da solução de eritrócitos e incubados por um período de 1 hora sob agitação lenta e constante (100 rpm) a 25 ± 2 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a porcentagem de metahemoglobina (metHb) em relação a

hemoglobina (Hb) total foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 630 nm e 540 nm, respectivamente. A porcentagem de metHb formada foi comparada com os valores obtidos para a fenilhidrazina (PH), um comprovado agente oxidante (ARBOS et al, 2008).

O potencial antioxidante foi analisado após o período de incubação de 1 hora referente à etapa descrita anteriormente, adicionou-se um 1 mmol/L do agente oxidante fenilhidrazina. As soluções foram aeradas e mantidas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por mais 20 minutos a 25 ± 2 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, diluídas em tampão fosfato (9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 5,7 g KH_2PO_4 para 1 L) e a porcentagem de metHb em relação a Hb total foi quantificada por espectrofotometria a 630 nm e 540 nm.

Segundo Camargo e colaboradores (2007) valores de metHb entre 1,9 e 2,0% são considerados normais enquanto que valores acima de 4%, elevados. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso em % de formação de meta-hemoglobina em função da hemoglobina - metHb (%Hb) - em comparação ao grupo controle positivo (Hb + Ph) (ARBOS et al, 2008).

4.3.3.2 Avaliação do potencial antioxidante da substância C100, em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio

A substância nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL foram distribuídas em tubos contendo 2 mL de uma suspensão de eritrócitos a 0,5% juntamente com uma solução de peróxido de hidrogênio (40 mM), sendo incubados por 2h a 25 ± 2 °C. Os grupos controle negativo (solução de eritrócitos - 0 % de hemólise), controle positivo (solução de eritrócitos na presença da solução de peróxido de hidrogênio - H_2O_2 40 mM - 100 % de hemólise) e um padrão (Hb + H_2O_2 + Vitamina C 1000 µg/mL).

Após 2h horas, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada fazendo-se a leitura de uma alíquota do sobrenadante por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al, 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso em comparação ao controle positivo (Hb + H_2O_2). Este

experimento foi realizado de acordo com o estudo de Bilton e colaboradores (2012), com pequenas modificações,

4.3.4 Atividade Antibacteriana

4.3.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a substância C100, foi realizado a técnica de microdiluição utilizando placas de 96 poços e fundo em “U” para cada cepa estudada. Inicialmente distribuiu-se 100 µL do meio BHI em todos os poços, exceto os da 1ª. linha que receberam 120 µL. Posteriormente, adicionou-se 80 µL da solução a 10 mg/mL de cada uma das substâncias aos poços da 1ª. linha e a partir daí se deu a diluição seriada a metade, obtendo-se as concentrações finais de 400 µg/mL até 25 µg/mL da substância C100. Por último, acrescentou-se 10 µL da suspensão de cada inóculo bacteriano (*Escherichia coli* ATCC 8539, *Escherichia coli* 101, *Escherichia coli* 2536, *Staphylococcus aureus* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Staphylococcus aureus* 47) nos poços, onde cada coluna da placa referiu-se a uma cepa bacteriana, especificamente. Foi utilizado como controles o antimicrobiano Cloranfenicol e o veículo DMSO.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para posterior leitura, realizada com a adição de 20µL de uma solução 0,01% (p/v) de resazurina sódica (SIGMA), um indicador colorimétrico de atividade metabólica.

Foi considerada como CIM para os produtos testados a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano quando comparado ao grupo controle, sendo verificado pela manutenção da cor azul da resazurina. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos dois ensaios (GERHARDT et al,1994).

4.3.4.2 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados com o software GraphPad Prism 6.0®, San Diego, CA, EUA, empregando-se o teste ANOVA e o teste t de Student não pareado, para análise. Seus valores foram expressos em média ± erro padrão da média (e.p.m.) ou desvio padrão da média (s.d.) e considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio *in silico*

5.1.1 *Molinspiration*

As propriedades moleculares da substância C100, calculadas no software *Molinspiration*, são representadas na Tabela 1.

A substância C100 apresenta uma boa biodisponibilidade teórica por via oral, já que atende aos requisitos preconizados pela — Regra dos cinco de Lipinski. Esta afirma que a substância ao atender 3 dos 4 parâmetros (miLogP, MM, nALH e nDLH) provavelmente terá uma boa biodisponibilidade quando administrado por via oral.

Tabela 1: Propriedades moleculares da substância C100 calculadas no software *Molinspiration*.

SUBSTÂNCIA	miLogP	MM	nALH	nDLH	TPSA	nrotb
C100	3,67	376,41	6	2	71,03	4
Padrão	≤5	≤500	≤10	≤5	≤140	≤10

Fonte: Dados da autora, 2018. miLogP – coeficiente de partição octanol/água; MM- peso molecular nALH – número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio; nDLH – número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; TPSA – área superficial polar topológica; nrotb – número de bandas rotáveis.

Possíveis atividades biológicas do composto C100 foram avaliadas, e este mostrou ser moderadamente ativo, tendo possíveis ações fisiológicas ao interagir com o GPCR, receptores nucleares, e inibindo quinases, proteases e outras enzimas, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Predição de bioatividades, calculadas no software *Molinspiration*, para a substância C100

SUBSTÂNCIA	Ligante GPCR	Modulador de canal de íon	Inibidor de quinase	Ligante de receptor nuclear	Inibidor de proteases	Inibidor de enzima
C100	-0,36	-0,62	-0,41	-0,38	-0,41	-0,31

Fonte: Dados da autora, 2018

5.1.2 AdmetSAR

O estudo farmacocinético da substância C100 foi realizado pelo programa AdmetSAR, que forneceu informações sobre seus possíveis locais de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET)

Diante dos resultados apresentados na Tabela 3, a substância C100 provavelmente é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, bem como pode sofrer absorção intestinal, e é permeável ao Caco-2. O composto C100 também mostrou não ser substrato da glicoproteína P e nem ser inibidor da mesma, bem como não interfere no transporte renal de cátions orgânicos.

Quanto a avaliação da distribuição e metabolismo, a substância C100 apresentou ser substrato apenas da enzima CYP450 3A4, além de não inibir nenhuma enzima deste complexo e apresentar baixa promiscuidade inibitória CYP.

No estudo da excreção e toxicidade, a C100 não apresentou toxicidade pelo teste de AMES, não foi classificada como carcinogênica, não é biodegradável e ainda está na categoria III de toxicidade oral aguda, que inclui compostos com DL_{50} superiores a 500 mol/kg e inferiores a 5000 mol/kg.

Tabela 3: Propriedades de classificação ADMET, calculadas no software admetSAR, para a substância C100.

Modelo	Substância C100
Absorção	
Barreira Hematoencefálica	BBB+
Absorção intestinal humana	HIA+
Permeabilidade ao Caco-2	Caco 2+
Substrato da glicoproteína P	NS
Inibidor da glicoproteína P	NI
Transporte renal de cátions orgânicos	NI
Distribuição e Metabolismo	
Substrato CYP450 2C9	NS
Substrato CYP450 2D6	NS
Substrato CYP450 3A4	Substrato
Inibidor CYP450 1A2	NI
Inibidor CYP450 2C9	NI
Inibidor CYP450 2D6	NI
Inibidor CYP450 2C19	NI
Inibidor CYP450 3A4	NI
Promiscuidade Inibitória do CYP	Baixa
Excreção e Toxicidade	
HERG	IF
Toxicidade no teste de AMES	NT
Carcinogênico	NC
Biodegradação	Não é biodegradável
Toxicidade aguda oral	III
Perfil ADMET previsto --- regressão	
Solubilidade aquosa	-3.2800 (LogS)
Permeabilidade Caco-2	1.0340 (LogPapp, cm/s)
Toxicidade	
Toxicidade Aguda em Ratos	2.4413 (DL ₅₀ , mol/kg)

Fonte: Dados da autora, 2018. NI – não inibe; NS – não substrato; S – substrato; I – inibe; IF- inibidor fraco; NT – não tóxico; NC – não carcinogênico; HERG- gene relacionado a éter-a-go-go humano

5.2 Ensaios de Citotoxicidade

5.2.1 Avaliação do potencial hemolítico da substância C100 em eritrócitos humanos

A substância C100, quando foi exposta aos eritrócitos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O, apresentou nenhuma ou baixa ação hemolítica (Tabela 4). Quando comparados com o grupo controle negativo, observou-se que até a concentração de 250 µg/mL não houve hemólise significativa para os tipos sanguíneos A e AB (Gráficos 1 e 2), já para os tipos B e O não houve hemólise significativa até a concentração de 100 µg/mL (Gráficos 3 e 4).

Tabela 4- Porcentagem de hemólise ocasionada pela substância C100 (µg/mL) em eritrócitos humanos

Tipo Sanguíneo	Substância C100 (µg/mL)					
	10	50	100	250	500	1000
A	0,62%	1,09%	0,8%	1,09%	3,96%	6,25%
B	0,27%	1,95%	2,25%	5,99%	10,61%	17,95%
AB	0,64%	0,68%	1,71%	1,67%	3,24%	6,59%
O	0,53%	0,57%	0,64%	1,1%	1,32%	2,79%

Fonte: Dados da autora, 2018.

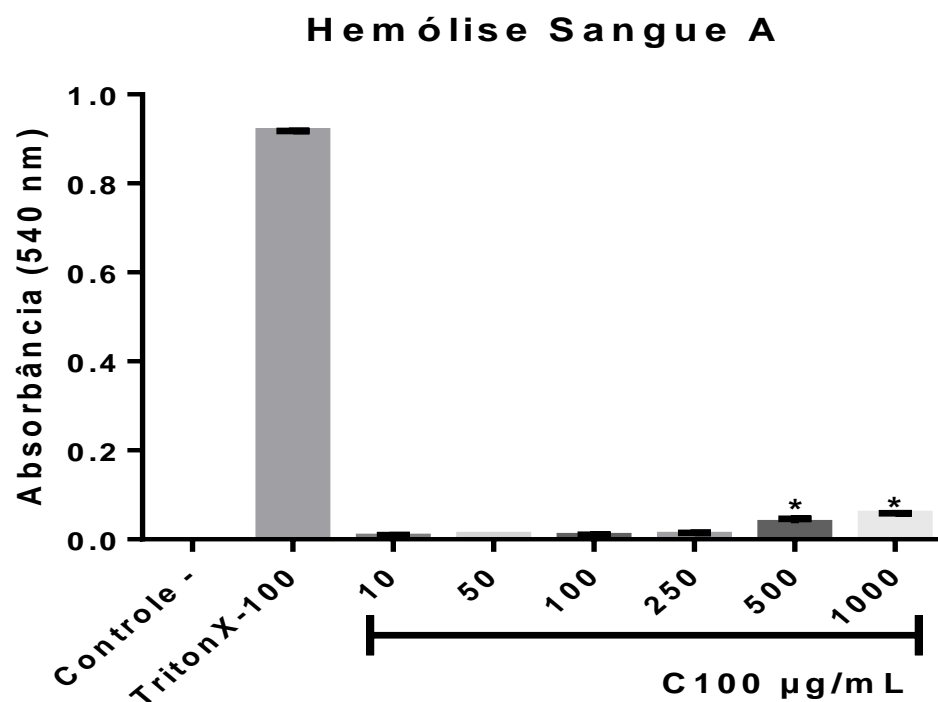


Gráfico 1: Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo A, induzida pela C100. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett, $p < 0,05$ ($n=3$). (Legenda: * $p < 0,05$)

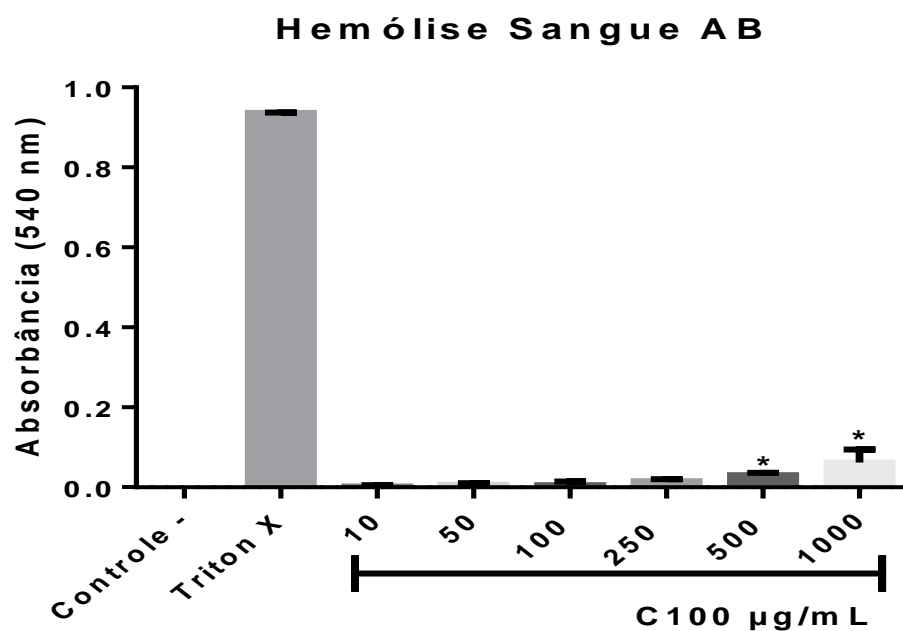


Gráfico 2: Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo AB induzida pela C 100. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett, $p < 0,05$ ($n=3$). (Legenda: * $p < 0,05$)

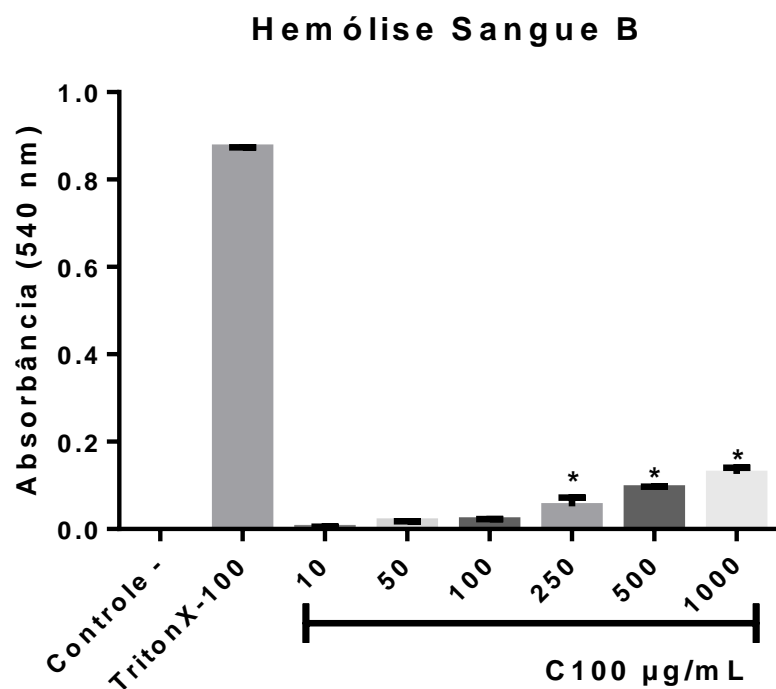


Gráfico 3: Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo B induzida pela C 100. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett, $p < 0,05$ ($n=3$). (Legenda: * $p < 0,05$).

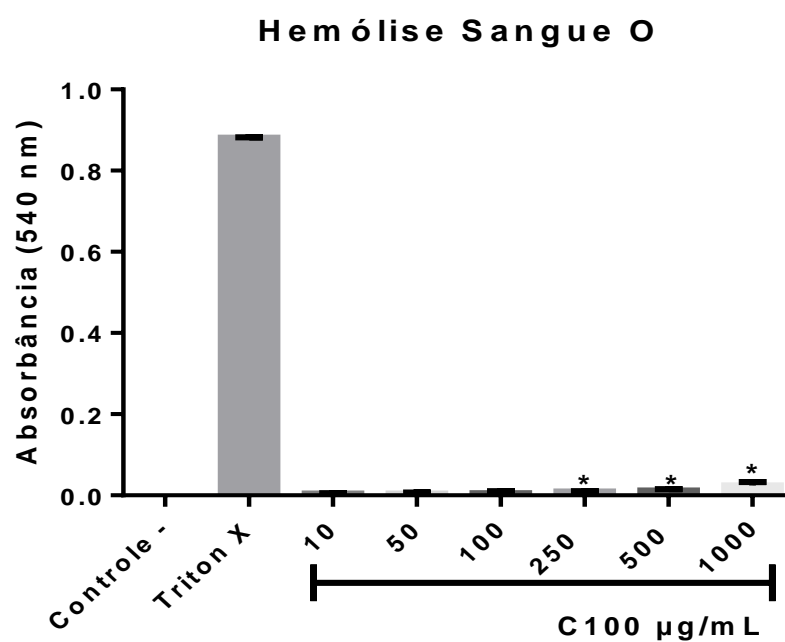


Gráfico 4: Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo O, induzida pela C 100. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett, $p < 0,05$ ($n=3$). (Legenda: * $p < 0,05$).

5.2.2 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença da substância C100

Foi avaliado a capacidade protetora da substância C100 sobre a membrana dos eritrócitos A, B, AB e O frente à uma solução hipotônica de NaCl 0,24% (Tabela 5). Observou-se que nas diferentes concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL, para o tipo sanguíneo O a substância C100 foi capaz de reduzir o estresse osmótico Gráfico 5. Já para os grupos sanguíneos A, B e AB, não houve redução da hemólise quando comparados com o grupo controle positivo (NaCl 0,24%), como pode ser visto nos Gráficos 6, 7 e 8.

Tabela 5- Porcentagem de hemólise ocasionado pela substância C100 (µg/mL) em eritrócitos humanos, após tratamento com uma solução hipotônica (NaCl 0,24%).

Tipo Sanguíneo	Substância C100 (µg/mL)					
	10	50	100	250	500	1000
A	97,65%	96,28%	99,88%	100%	98,87%	96,24%
B	99,46%	100%	100%	98,96%	98,77%	99,39%
AB	100%	100%	100%	99,84%	99,84%	100%
O	87,21%	87,74%	86,99%	86,14%	88,02%	84,51%

Fonte: Dados da autora, 2018.

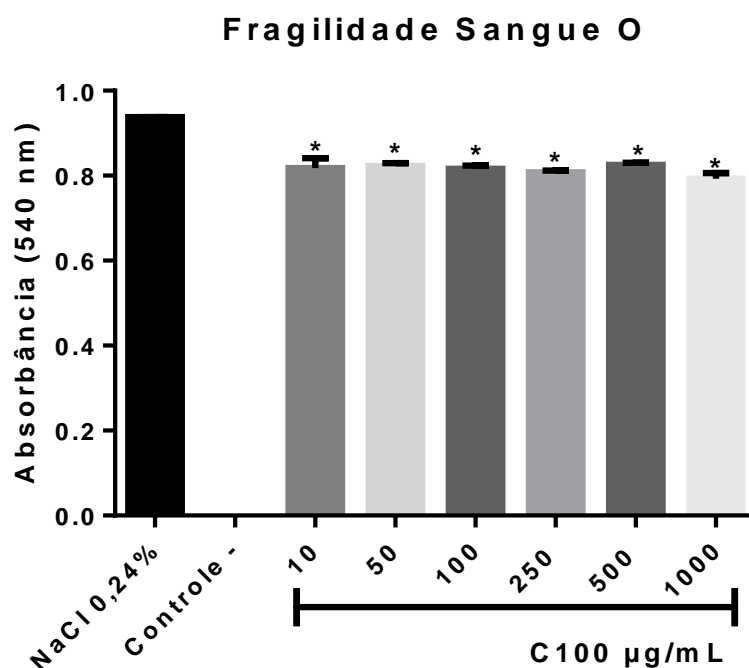


Gráfico 5. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo O induzida pela C 100, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett., $p < 0,05$ ($n=3$). (Legenda: * $p < 0,05$).

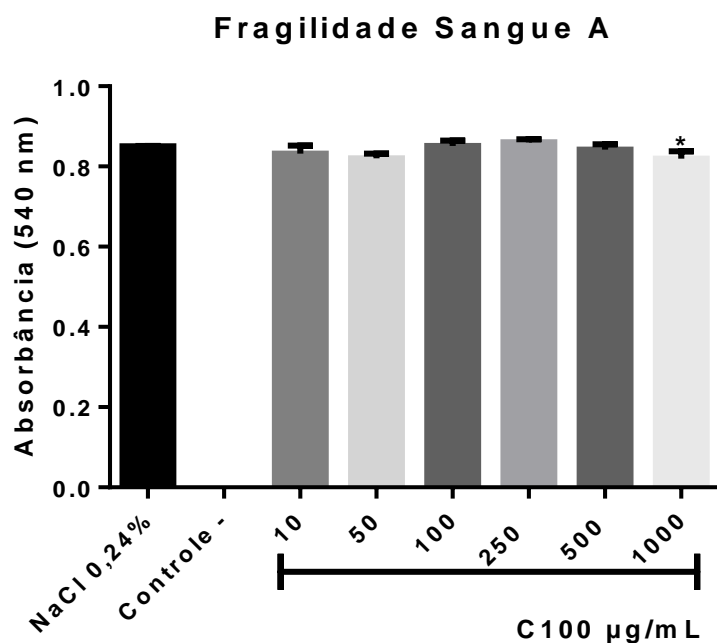


Gráfico 6. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo A, induzida pela C 100, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett., $p < 0,05$ ($n=3$). (Legenda: * $p < 0,05$).

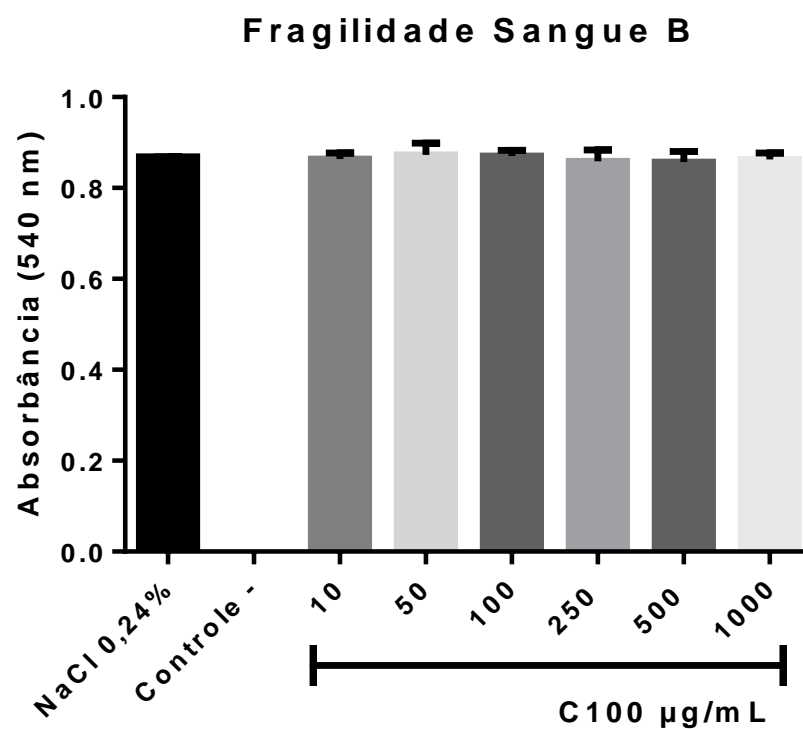


Gráfico 7. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo B, induzida pela C 100, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett., $p < 0,05$ ($n=3$).

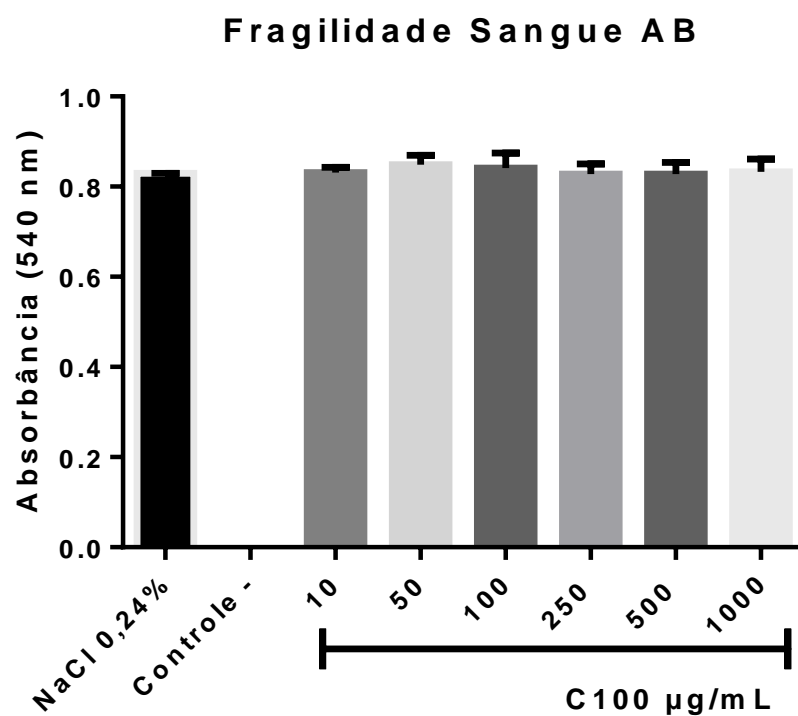


Gráfico 8. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos do tipo AB, induzida pela C 100, quando em

solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett., $p < 0,05$ ($n=3$).

5.3 Atividades Oxidante e Antioxidante

5.3.1 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante da substância C100, em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina

A capacidade oxidante da substância C100 foi verificada através da porcentagem de meta-hemoglobina/hemoglobina formada, a partir da incubação com eritrócitos do tipo O. Sendo observado que, ao comparar com o controle negativo a substância C100 não apresentou poder oxidante em nenhuma das concentrações estudadas (10, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), como pode ser observado no Gráfico 9.

Já ao avaliar a capacidade antioxidante da substância C100, observou-se que esta apresentou potencial antioxidante em todas as concentrações analisadas quando comparados com o controle positivo (Hb+ Ph), como expressa o Gráfico 10.

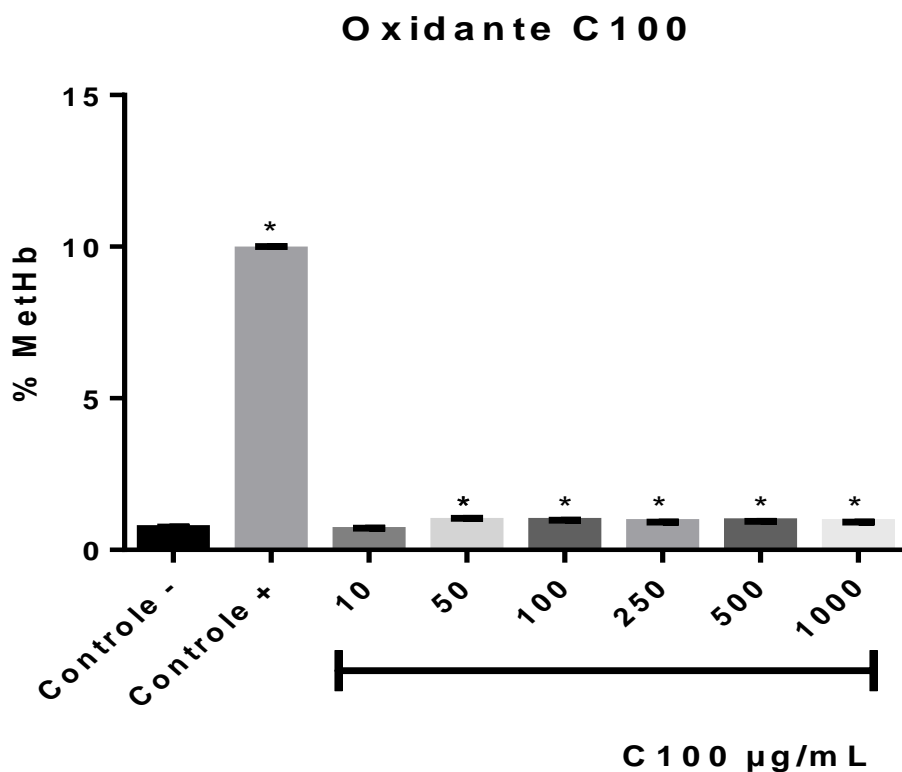


Gráfico 9: Efeito oxidante da C100 em eritrócitos humanos do tipo O. Os resultados estão expressos como percentual da média de formação de meta-hemoglobina (MetHb) em comparação ao grupo controle negativo (ensaio oxidante). Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett (n=3). (Legenda: * p<0,05)

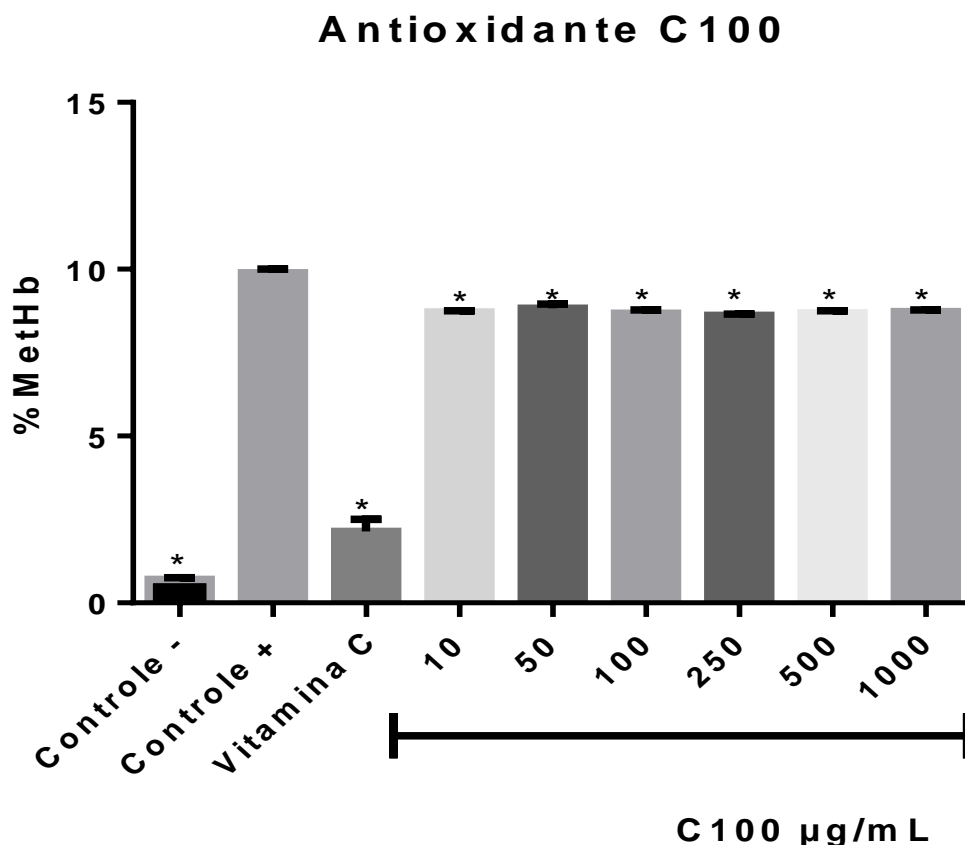


Gráfico 10: Efeito antioxidante da C100 em eritrócitos humanos do tipo O. Os resultados estão expressos como percentual da média de formação de meta-hemoglobina (MetHb) em comparação ao controle positivo (ensaio antioxidante). Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett (n=3). (Legenda: * p<0,05)

5.3.2 Avaliação do potencial antioxidante da substância C100 em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio

Ao analisar a ação da substância C100 em eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos O, A, B e AB na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), observou-se que para todas as concentrações testadas, (10, 50, 100, 250 e 1000 µg/mL) houve redução da hemólise. E ao comparar com o controle positivo (Hb + H_2O_2) a substância C100 mostrou ter atividade antioxidante.

No Gráfico 11, nota-se que as concentrações 50, 100, 250 e 500 µg/mL,

frente ao sangue tipo O, tiveram maior atividade antioxidante que a vitamina C, esta que já é conhecida por ser sequestradora de radicais livres. Já para o sangue tipo A, conforme o Gráfico 12 as concentrações 50, 250, 500 e 1000 µg/mL, foram as que apresentaram atividade antioxidante melhor que a vitamina C. Para o sangue tipo B, apenas a concentração de 1000 µg/mL apresentou esse fato (Gráfico 13), e para o sangue tipo AB, todas as concentrações reduziram a hemólise mais que a vitamina C como mostra o gráfico 14.

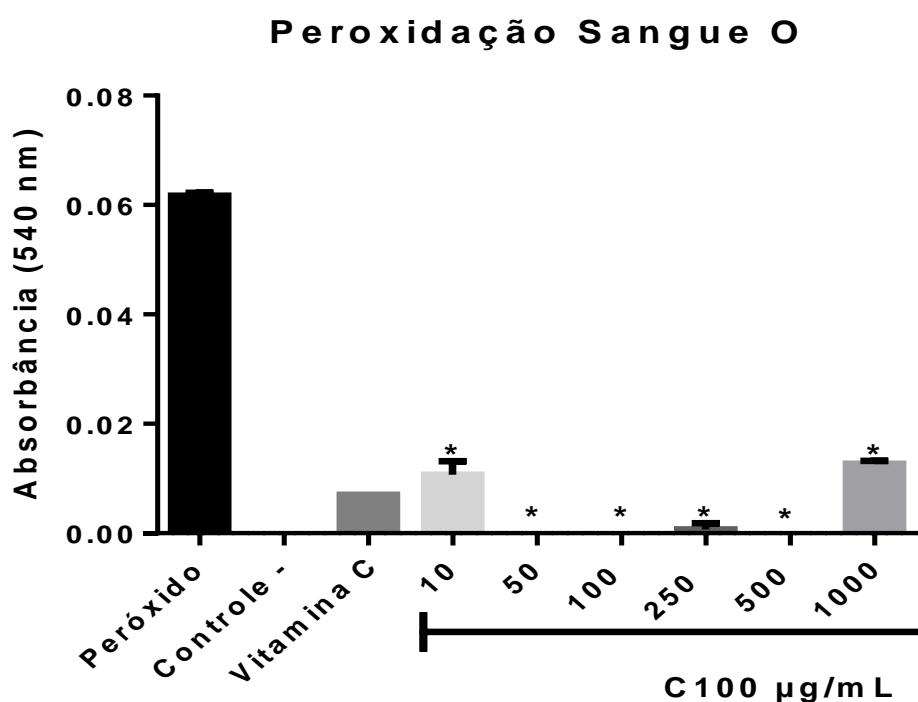


Gráfico 11: Atividade antioxidante da substância C100 frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo sanguíneo O. Os resultados estão expressos como percentual da média em comparação ao grupo controle positivo (Hb + H₂O₂). Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. (n=3). (Legenda: * p<0,05)

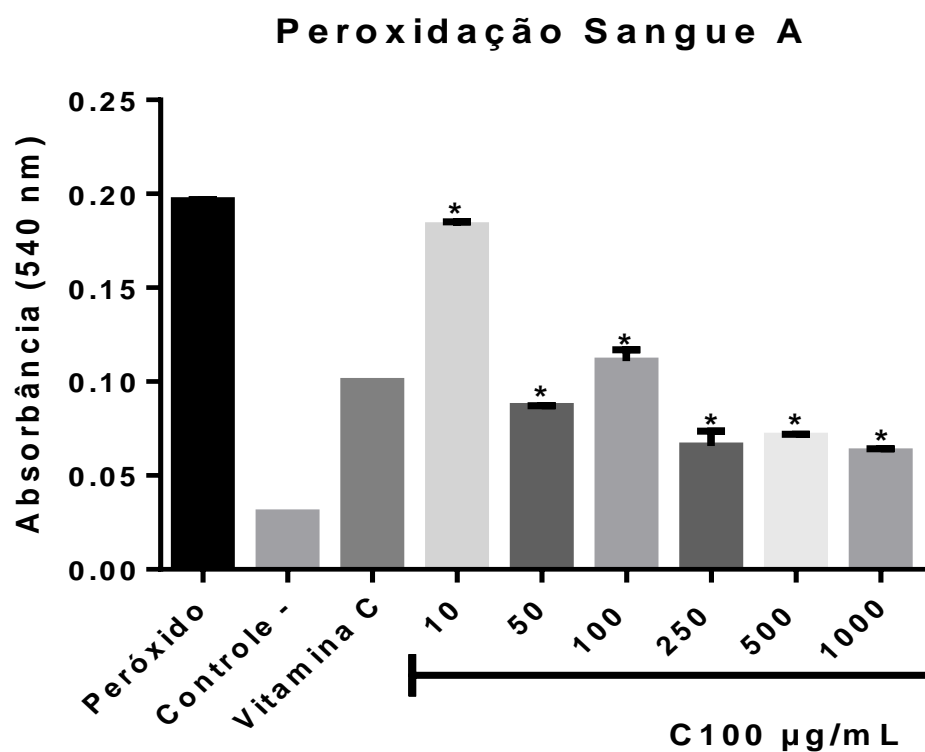


Gráfico 12: Atividade antioxidante da substância C100 frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo sanguíneo A. Os resultados estão expressos como percentual da média em comparação ao grupo controle positivo (Hb + H₂O₂). Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett (n=3). (Legenda: * p<0,05)

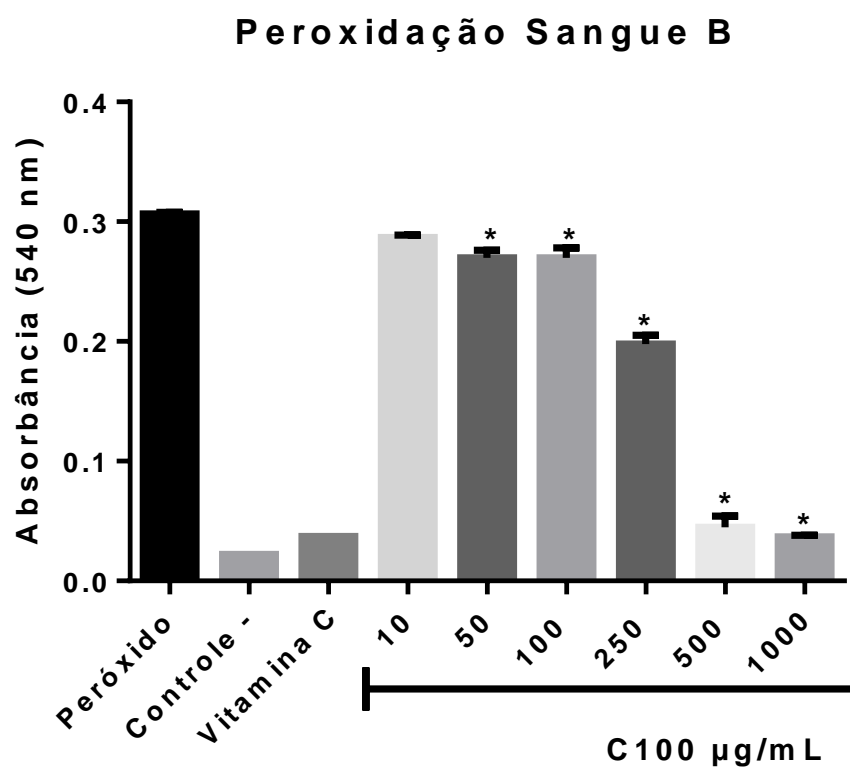


Gráfico 13: Atividade antioxidante da substância C100 frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo sanguíneo B. Os resultados estão expressos como percentual da média em comparação ao grupo controle positivo (Hb + H₂O₂). Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett (n=3). (Legenda: * p<0,05)

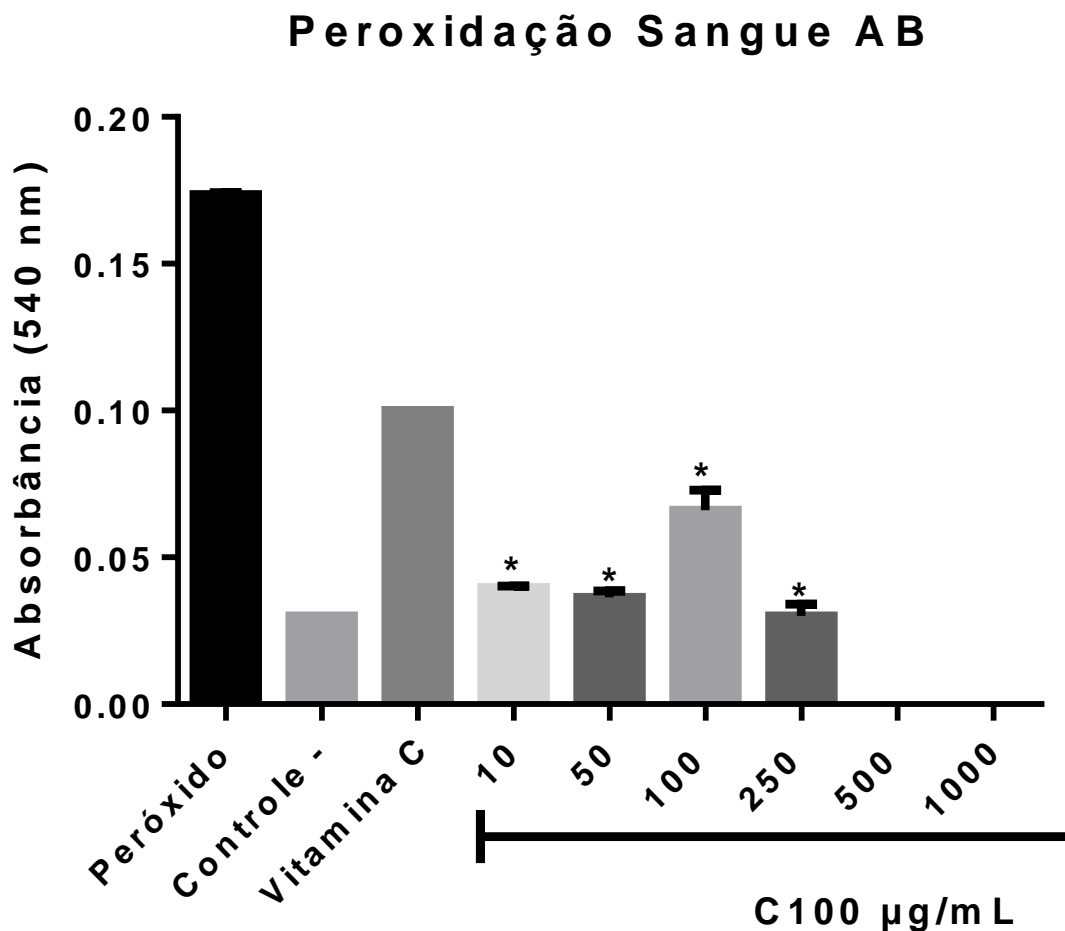


Gráfico 14: Atividade antioxidante da substância C100 frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo sanguíneo AB. Os resultados estão expressos como percentual da média em comparação ao grupo controle positivo (Hb + H₂O₂). Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. (n=3). (Legenda: * p<0,05)

5.4 Atividade Antibacteriana

5.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A substância C100, foi exposta a 6 diferentes cepas bacteriana para determinação da CIM, sendo estas: *Escherichia coli* ATCC 8539, *Escherichia coli* 101, *Escherichia coli* 2536, *Staphylococcus aureus* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* 25925, *Staphylococcus aureus* 47. Entretanto não foi observado atividade antibacteriana para a substância estudada.

Díscussão

6 DISCUSSÃO

O estudo *in silico* é uma ferramenta que possibilita a otimização de tempo e custo às pesquisas de novos medicamentos, já que através de programas computacionais é possível avaliar a provável atividade biológica que uma molécula pode apresentar (MOHAMED et al., 2016).

Como mostrado na Tabela 1 a substância C100 se enquadrando em todos os parâmetros da “Regra dos cinco” de Lipinski, que preconiza: peso molecular inferior ou igual a 500Da, número de ligações de hidrogênio doador inferiores ou igual a 5 (nDLH), número de ligações de hidrogênio aceitador inferiores ou igual a 10 (nALH) e miLogP inferior ou igual a 5 (LIPINSKI et al., 2001; DIRAR et al., 2016).

A hidrofobicidade, tamanho, flexibilidade, distribuição eletrônica e características de ligação de hidrogênio, são propriedades importantes a serem avaliadas em uma molécula, pois influenciam seu comportamento em um organismo vivo, bem como sua biodisponibilidade, toxicidade, propriedades de transporte, afinidade para proteínas, reatividade, estabilidade metabólica, entre outros (TARIQ et al., 2016).

O peso molecular é um fator importante na ação farmacológica da droga, tendo em vista que fármacos com peso molecular < 500 Da tem maior facilidade para serem transportadas, difundidas e absorvidas quando comparadas a moléculas pesadas (SRIMAI et al, 2013; DIRAR et al, 2016).

A lipofilicidade pode ser avaliada pelos valores de miLog P – (coeficiente de partição octanol/água), que sendo menor ou igual a 5, significa que a substância consegue ultrapassar as biomembranas. O estudo da área de superfície polar topológica (TPSA) também avalia a biodisponibilidade, valor menor ou igual a 140 Å² indica uma boa absorção intestinal da substância e sua permeabilidade ao Caco-2 e penetração pela barreira hematoencefálica. Quanto mais lipofílica a substância, maior vai ser sua capacidade de atravessar as membranas celulares, tendo em vista a composição fosfolipídica destas (BARBOSA JÚNIOR et al, 2015; CHIEN et al, 2017). Uma outra característica na avaliação da TPSA, é que este parâmetro está relacionado com o potencial

de ligação ao hidrogênio, já que é calculado a partir das áreas de superfície ocupadas por átomos de oxigênio e nitrogênio e por átomos de hidrogênio presos a eles (PARAMASHIVAM et al 2015; UDDIN et al 2015; TARIQ 2016; MABKHOT 2016).

A flexibilidade de uma molécula pode ser avaliada pelo número de bandas rotáveis (nrotb), quanto maior o número de ligações simples, mais flexível é a molécula, portanto maior é a interação com o sítio alvo, tendo uma melhor biodisponibilidade (PARAMASHIVAM et al, 2015). Uma substância com ≤ 10 ligações rotativas (nrotb) e área de superfície polar total (TPSA) $\leq 140 \text{ \AA}$, tem uma boa biodisponibilidade (DIRAR et al 2016; VEBER et al 2002;). No estudo atual, a substância C100, com um TPSA igual a 71,03 \AA e um nrotb igual a 4, indica alta probabilidade de ter uma boa biodisponibilidade oral. Além do que os valores de LogP calculados concordaram com a regra de cinco de Lipinski, bem como TPSA, contagem total de ligações de hidrogênio e uma série de ligações rotativas dentro dos limites.

O estudo da biodisponibilidade de uma droga é um parâmetro importante, pois, fármacos que apresentam uma baixa biodisponibilidade precisam de doses maiores para atingir o plasma e seu efeito farmacológico, podendo levar a efeitos colaterais graves (WADHWA SINGHAL, RAWAT 2014). A polaridade da molécula propicia baixa biodisponibilidade, bem como a instabilidade do pH e a morte microbiana durante a passagem gastrointestinal (MUELLER et al., 2018). Uma solução encontrada para essas substâncias com baixa biodisponibilidade, é associa-las à agentes chamados de *Bioenhancers*. Estes potencializam o efeito farmacológico da droga aumentando sua biodisponibilidade, através do aumento da difusão passiva ou inibindo os transportadores de efluentes (BARVE et al., 2015).

Assim como a substância C100, BOULEY et al (2016), também mostra um composto pertencente a classe das quinazolinonas que possui uma boa biodisponibilidade oral, a (E)-3-(3-Carboxyphenyl)-2-(4-ethynylstyryl)quinazolin-4(3H)-one.

Ainda através do *Molinspiration*, foi possível prever a bioatividade da substância C100. Na qual, tendo base que se a molécula apresentar uma

pontuação superior a 0,00 é capaz de possuir atividades biológicas consideráveis, valores de -0,50 a 0,00 deve ser moderadamente ativa e se a pontuação for inferior a -0,50, presume-se ser inativa (PARAMASHIVAM et al., 2015). Sendo assim, o composto C100 mostrou ser moderadamente ativa, tendo possíveis ações fisiológicas ao interagir com os receptores acoplados a proteína G (GPCR), receptores nucleares, e inibindo quinases, proteases e outras enzimas.

Os fármacos se ligam predominantemente em um dos seguintes alvos: receptores acoplados a proteína G (GPCRs), canais iônicos, cinases, receptores de hormônio nuclear ou proteases (RASK-ANDERSEN, MASURAM, SCHIÖTH, 2014; HAUSER et al., 2017). Os receptores acoplados a proteína G (GPCRs) formam a maior família de proteínas de membrana humana. Estudos mostram que > de 25% dos fármacos aprovados pela FDA ("Food and Drug Administration") agem nesses receptores (BOYHUS et al., 2018). Os GPCRs participam consideravelmente da fisiopatologia humana e de ações farmacológicas, sendo os principais alvos de drogas mais intensamente estudado (HAUSER et al., 2017; PÁNDY-SZEKERES et al., 2017). Todos os GPCRs são transmembranares, e transportam o sinal do ligante extracelular à proteína de sinalização intracelular (PÁNDY-SZEKERES et al., 2017).

Os receptores nucleares são fatores de transcrição que regulam diversas atividades quando ativados por um ligante. Existem vários tipos de receptores nucleares, o típico apresenta dois domínios principais: um de ligação ao DNA e o outro ao ligante. Regulam o crescimento, desenvolvimento e reprodução celular. (CAVE et al., 2016; BODOFSKY, KOITZ, WIGHTMAN 2017). Composto inibidores de quinases podem modificar ou até mesmo bloquear vias de sinalização, sendo estratégia promissora para o desenvolvimento de medicamentos (PARAMASHIVAM et al., 2015).

A farmacocinética é um ponto essencial no desenvolvimento de um medicamento. Logo, má absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) bem como a toxicidade são pontos cruciais que devem ser considerados no início de uma pesquisa em uma molécula candidata a um futuro medicamento (DIRAR et al., 2016). Com o programa AdmetSAR foi

possível prever algumas destas características da substância C100.

De acordo com o programa AdmetSAR, a substância C100 é capaz de atingir o sistema nervoso central (SNC), atravessando a barreira hematoencefálica. Para que isso aconteça, características como, a molécula ter baixo peso molecular e ser lipofílica são essenciais (DE FALCO et al., 2016), e estas são encontradas na substância C100.

Para administração de fármacos, a via oral é a mais comum, sendo necessário que o composto tenha uma boa solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal para que se tenha o efeito terapêutico desejado. Por meio de modelos *in vitro* é possível prever a permeabilidade dos fármacos através de membranas do trato gastrointestinal (TGI). As células Caco-2 são extraídas de adenocarcinoma de cólon humano, estas em cultura se diferenciam em enterócitos e podem prever a absorção oral de fármacos por transporte passivo (transcelular e paracelular), o que é de grande valia para a indústria farmacêutica no estudo farmacocinético dos fármacos (De SOUZA, FREITAS, STORPIRTS, 2007; OLANDER et al., 2016).

A substância C100 mostrou ser positiva para os modelos de absorção no intestino humano e permeabilidade em Caco-2, caracterizando ter uma boa solubilidade e permeabilidade intestinal. Ainda, esta substância mostrou não ser substrato da glicoproteína P, o que é bom, tendo em vista que essa glicoproteína é uma bomba de efluxo de drogas e de vários compostos, e está envolvida em processos de modulação da absorção e distribuição, podendo provocar uma falha terapêutica e interações medicamentosas (CALADO et al., 2014; REIS et al., 2015).

O transporte renal de cátions é responsável pela excreção de compostos orgânicos incluindo fármacos, e este transporte não é inibido pela substância C100, não sendo prejudicial à excreção (ALBERTONI, SCHOR, 2014).

O sistema citocromo P450 é um conjunto de monooxigenases que estão ligadas a membrana do retículo endoplasmático liso do fígado e em outros tecidos extra-hepáticos. As enzimas do citocromo P450 (CYP-450) realizam um papel essencial na farmacologia das drogas e na toxicologia dos xenobióticos. São responsáveis pela metabolização de 75% dos fármacos atualmente

utilizados (GOLAN et al., 2014). Existem substâncias que são capazes de inibir esse conjunto de enzimas, interrompendo o metabolismo de fármacos quando administrados simultaneamente, o que leva ao aumento dos seus níveis plasmáticos podendo alcançar concentrações tóxicas e também pode prolongar a presença do fármaco ativo no organismo. Ainda, estas enzimas podem sofrer indução, aumentando o metabolismo do fármaco, assim este fica menos tempo no organismo, reduzindo as concentrações do fármaco abaixo de seus níveis terapêuticos ou aumentando a incidência de toxicidade através da produção de metabólitos reativos (AHMMED et al, 2016; CLARIVET et al 2016; GOLAN et al., 2014; NELSON et al 2016).

A substância C100 como mostrado na tabela 3, não é capaz de inibir nenhuma enzima do complexo CYP450, mas apresentou ser substrato da CYP450 3A4. Esta isoenzima é responsável por metabolizar cerca de 50% de todos os fármacos utilizados atualmente (AHMMED et al, 2016).

O gene humano relacionado com o éter-a-go-go- humano (hERG) é responsável por codificar subunidades que formam poros de canais de potássio de retificador retardado de ativação rápida (IKr). Esses canais são importantes na repolarização cardíaca, logo, ao ocorrer alguma disfunção nos genes hERG pode ocasionar problemas cardíacos fatais (LAMOTHE et al 2016). A substância C100 mostrou ser um inibidor fraco desses genes, possivelmente não cause sérias interferências ao potencial de ação cardíaco.

O teste de AMES ou ensaio de reversão de mutação em *Salmonella typhimurium*, é um teste de triagem realizado para identificação de substâncias com potencial mutagênico através da substituição de pares de bases (SOLCIA et al, 2016). O programa AdmetSAR prediz que a substância C100 não tem potencial mutagênico e nem carcinogênico.

A substância C100 não é biodegradável, sendo que a biodegradação é um fator importante no tratamento de águas através da eliminação de compostos contaminantes, incluindo fármacos (RIBEIRO et al, 2016). Quanto a classificação da toxicidade aguda oral, a categoria III significa uma DL_{50} na dose de 500-5000 mg/Kg, e foi nessa categoria que a substância C100 se enquadrou, com uma DL_{50} de 2.4413 tendo portanto uma toxicidade regular.

Diante desses resultados do *in silico*, sugere-se que a substância C100 tem boa biodisponibilidade por via oral, tendo boa absorção, baixa toxicidade teórica, sofre metabolização pela CYP450 3A4, não é carcinogênico nem mutagênica. Sendo assim uma substância com grandes perspectivas para estudo *in vitro*.

Para o desenvolvimento de novos medicamentos é necessário que sejam realizados estudos biológicos *in vitro*. Estes permitem uma avaliação preliminar da análise citotóxica de determinada substância, seja ela proveniente de plantas ou sintéticas. Favorecendo assim a diminuição do número de animais em experimentos posteriores, que é uma preocupação dos comitês de ética em uso animal (MOTTI, PORTO, ROEL, 2015; JENSEN et al, 2017).

Os eritrócitos são células comumente utilizadas nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* por apresentarem uma membrana semelhante à outras células, além de serem facilmente acessíveis. A hemólise causada por substâncias testes está relacionada com sua composição química e a forma como interagem com a célula (NARDID et al, 2015; SUMATHI, ANURADHA 2016; SUGANTHY 2018).

Os alelos gênicos A e B codificam diferentes glicosiltransferases que adicionam N-acetilgalactosamina e D-galactose aos eritrócitos, que são convertidos em antígenos presentes nos sorotipos A e B, respectivamente. Ambos os antígenos estão presentes no grupo AB enquanto que o alelo O codifica uma enzima não funcional, assim o grupo sanguíneo O não apresenta nenhum dos antígenos (BATISSOCO, NOVARETTI, 2003; PAIVA 2009; MUÑOZ-VAHOS, GARCÍA- JIMÉNEZ, VILLA-PALACIO, 2014).

A ruptura da membrana eritrocitária com a liberação da hemoglobina no plasma, leva a sérios danos em órgãos como rins, coração e fígado. Sendo portanto o teste hemolítico um bom método para a avaliação da citotoxicidade, onde por meio deste previne-se a administração de possíveis agentes causadores de anemia hemolítica (PEREIRA et al, 2016).

Desta forma, verificamos que a substância C100 nas suas diferentes concentrações causou baixa hemólise aos eritrócitos de todos os grupos

sanguíneos testados, já que não provocou nem 20% de hemólise (PROKOF'EVA et al., 2004).

Na tabela 4 verificamos a porcentagem das hemólises provocadas pela substância C100, que foi variável. Sendo o sangue B o que sofreu maior hemólise, provavelmente a substância C100 tenha uma maior interação com os antígenos presentes na membrana dos eritrócitos tipo B.

Fragilidade osmótica consiste na susceptibilidade de eritrócitos à hemólise quando se tem uma variação da pressão osmótica. A fragilidade das células vermelhas levando à hemólise pode ser influenciada por diversos fatores como: pH, temperatura, oxigenação, tamanho, idade e composição da membrana celular (AYRES, BIRGEL JÚNIOR, MARTINS 2014; SINKALU 2015). Quando a membrana eritrocitária sofre alterações em sua composição, esta torna-se mais frágil osmoticamente, perdendo sua elasticidade e aumentando a rigidez, sendo mais propensa a sofrer lise (ANSARI, ALI, MAHMOOD, 2015; NIGRA et al, 2016).

Os eritrócitos ao entrarem em contato com a solução hipotônica (NaCl 0,24%), sofrem hemólise devido a perda osmótica dos eletrólitos intracelulares e dos componentes fluidos (SUMATHI, ANURADHA 2016).

O produto sintético C100 pode atuar inibindo este processo, estimulando ou não o efluxo dos componentes celulares. Como foi observado para o sangue O, a molécula C100 foi capaz de proteger a membrana das hemácias do estresse osmótico (Gráfico 5), o que não ocorreu para os grupos sanguíneos A, B e AB (Gráficos 6, 7 e 8).

Com estes resultados, verifica-se que a substância C100 causou alterações relevantes na composição da membrana eritrocitária dos grupos sanguíneos A, B e AB, como também observado na tabela 5. Possivelmente a molécula C100 interagiu com os antígenos presentes na membrana desses grupos sanguíneos, já que para o sorotipo O, a mesma protegeu os eritrócitos do estresse oxidativo sofrido. Ao avaliar a fragilidade osmótica pode-se obter conhecimento a respeito da interação entre as substâncias e a membrana dos eritrócitos, o que é interessante para o estudo da toxicidade de novas substâncias (DUARTE et al, 2016).

A oxidação é um processo normal aos organismos vivos, entretanto quando em excesso podem causar sérios danos às células, como peroxidação lipídica, oxidação de DNA e proteínas ocasionando até mesmo apoptose. Desordens na estrutura das células vermelhas podem levar ao estresse oxidativo. Sendo assim, os eritrócitos são bons modelos para avaliação da capacidade protetora ou tóxica de substâncias (LIU et al, 2014; REIS, BARBOSA, RAMOS 2017).

Para avaliar o potencial oxidante e antioxidante da substância C100, foi utilizado a fenilhidrazina como agente oxidante de eritrócitos, verificando-se o percentual de formação da meta-hemoglobina em função da hemoglobina.

O gráfico 9 mostra que a substância C100 não causou oxidação em nenhuma das concentrações testadas e apresentou ser antioxidante na presença de fenilhidrazina (gráfico 10).

Os antioxidantes apresentam como principal propriedade, a capacidade de neutralizar ou sequestrar radicais livres. Agindo na etapa inicial ou durante o processo oxidativo. Os antioxidantes também agem prevenindo mutações em DNA humanos, como foi visto em testes *in vitro* com células humanas, reduzindo mutações causadas por estresse oxidativo (MERINO et al, 2015).

Já que tanto os radicais livres como outros agentes oxidantes podem causar doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cerebrais, declínio do sistema imune, câncer e diabetes melitus tipo I (MERINO et al, 2015; NUNES et al, 2014). O retardo da velocidade de oxidação e a manutenção do equilíbrio de radicais livres são importantes na prevenção de doenças, e ganham ainda mais força quando associados aos mecanismos de defesa antioxidante do organismo (MARTELLI, NUNES et al, 2014).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado em vários processos biológicos, mas quando em excesso pode ser prejudicial para as células e tecidos. Ele é altamente permeável à membrana celular sendo tóxico para as células, por isso é comumente utilizado como agente tóxico em modelos *in vitro* na investigação de danos causados por estresse oxidativo (LIU et al, 2014; SIES et al, 2017).

Ao avaliar a atividade antioxidante da substância C100 nos eritrócitos

dos grupos sanguíneos A, B, AB e O na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs), foi observado sua capacidade de sequestrar as EROs. Em todas as concentrações analisadas reduzindo a hemólise induzida pelo H₂O₂, sendo portanto antioxidante.

No gráfico 11 vemos que a substância C100 nas concentrações 50, 100, 250 e 500 µg/mL apresentou atividade antioxidante melhor que a vitamina C, isso para o grupo sanguíneo O. Já para o grupo sanguíneo A, foram as concentrações 50, 250, 500 e 1000 µg/mL, como observado no gráfico 12. No gráfico 13 para o grupo sanguíneo B, mostra que apesar de em todas as concentrações a substância C100 ser antioxidante, nenhuma foi melhor que a vitamina C. Já no grupo sanguíneo AB todas as concentrações apresentaram atividade antioxidante melhor que a vitamina C, como visto no gráfico 14. Sendo assim, de uma forma geral, podemos atribuir uma boa atividade antioxidante a substância C100, tanto frente a fenilhidrazina como ao peróxido de hidrogênio.

Várias substâncias que compõem a classe das quinazolinonas apresentam atividade antimicrobiana comprovada. (EL-SAYED et al, 2017; MOHAMED et al, 2013; SINGH, 2015; Peng et al, 2015). Bouley et al (2016) demonstrou em suas pesquisas que a (E)-3-(3-Carboxyphenyl)-2-(4-ethynylstyryl)quinazolin-4(3H)-one apresenta potente atividade contra cepas resistentes à metilicina (MRSA), baixa depuração e boa biodisponibilidade oral. Sendo um ótimo candidato a antibiótico, o que é de suma importância tendo em vista o avanço da resistência bacteriana aos antibacterianos existentes.

Sabendo que muitos compostos pertencentes a classe quinazolinona agem contra a ação bacteriana, foi avaliado o potencial antibacteriano do composto: 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-3-phenyl-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one, ("C100"). Entretanto, para todas as cepas avaliadas (*Escherichia coli* ATCC 8539, *Escherichia coli* 101, *Escherichia coli* 2536, *Staphylococcus aureus* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* 25925, *Staphylococcus aureus* 47) a substância C100 não apresentou ação antibacteriana.

A composição estrutural das quinazolinonas é um fator determinante na forma como elas agem farmacologicamente. Conforme o grupo químico que for

adicionado nos anéis da estrutura base dessa classe, pode ou não ter atividade antimicrobiana. Bouley et al (2016) em seus estudos mostrou que através de modificações na estrutura da substância, conseguiu identificar 77 análogos selecionados para atividade antibacteriana, dos quais 44 atividades exibidas ($\text{CIM} \leq 4 \mu\text{g} / \text{mL}$) eram contra *S. aureus*. Substituintes como fluor, cloro, nitrilo, grupos metilo, amina ou tiol a depender da posição inserida, conferem a molécula uma boa atividade antimicrobiana (ZAYED, HASSAN, 2014; JAFARI et al., 2016).

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que:

No estudo *in silico* a substância C100 apresenta uma boa biodisponibilidade teórica após administração oral, baixo risco de toxicidade, por não ter demonstrado potencial mutagênico e carcinogênico.

A substância C100 possui baixa citotoxicidade, uma vez que induziu baixa hemólise nas concentrações testadas. Entretanto a C100 não foi capaz de proteger os eritrócitos na presença de solução hipotônica (NaCl 0,24 %), com exceção do grupo sanguíneo O, sugerindo que esta substância tem interação com os antígenos da membrana eritrocitária, e assim interfere no funcionamento da mesma.

De acordo com os testes *in vitro*, a substância C100 não induziu oxidação da hemoglobina, e apresentou bom efeito antioxidante na presença de fenilhidrazina, reduzindo a formação da metahemoglobina. E apresentou efeito antioxidante frente ao peróxido de hidrogênio, sugerindo uma ação sequestradora de radicais livres.

As substâncias C100, não apresentou atividade antibacteriana, uma vez que não inibiu o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram- negativas padrão nem as de origem clínica.

Diante dos resultados obtidos, a substância C100 apresenta baixa citotoxicidade, sendo uma molécula farmacologicamente promissora.

Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Ahmmed SM, Mukherjee PK, Bahadur S, Harwansh RK, Kar A, Bandyopadhyay A, et al. CYP450 mediated inhibition potential of *Swertia chirata*: An herb from Indian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;178: 34–39.
2. Al-amiery A, Kadhum AAH, Shamel M, Satar M, Khalid Y, Mohamad AB. Antioxidant and antimicrobial activities of novel quinazolinones. *Medicinal Chemistry Research*. 2014; 23: 236–242.
3. Albertoni G, Schor N. Resveratrol desempenha importante papel no mecanismo de proteção na doença renal - mini-revisão. *Brazilian Journal of Nephrology*. 2015; 37(1):106-114.
4. Andrade EL, Bento AF, Cavalli J, Oliveira SK, Freitas CS, Marcon R, et al. Non clinical studies required for new drug development- Part I: early *in silico* and *in vitro* studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2016; 49(11): 1-9.
5. Ansari FA, Ali SN, Mahmood R. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. *Toxicology in vitro*. 2015; 29: 1878-1886.
6. ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015.
7. Arbos KA, Claro LM, Borges L, Santos CA, Weffort-Santos AM. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*. 2008; 28(7): 457-463.
8. Ayres MCC, Birgel EH, Birgel Júnior EH, Martins LEP. Influence of Age, Sex and Breed Lines of Zebu Nellore Cattle on the Erythrocytes Osmotic Fragility, raised in São Paulo, Brazil. *International Journal of Applied Science and Technology*. 2014; 4(5): 70-75.
9. Batisso AC, Novaretti MCZ. Molecular aspects of ABO blood group system. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2003; 1: 47-56.

10. Barbosa Júnior SA, Baptista RIAA, Barbosa CN. Fisiologia comparada do fluído oral e suas principais aplicações clínicas. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. 2015; 18(4): 259-268.
11. Belló C, Schemberger JA, Machado WM, Fernandes D, Velloso JCR. O cetoprofeno como oportunidade terapêutica no estresse oxidativo: uma revisão. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2015; 36(1):123-129.
12. Benfenati E, Como F, Marzo M, Gadaleta D, Toropov A, Toropov A. Developing innovative *in silico* models with EFSA's OpenFoodTox database. *External Scientific Report*. 2017; 14(7).
13. Bilton YY, Suboh S, Aburjai T, Abdalla S. Structure-activity relationships regarding the antioxidant effects of the flavonoids on human erythrocytes. *Natural Science*. 2012; 4(9): 740-747.
14. Bodofsky S, Koitz F, Wightman B. Conserved and exapted functions of nuclear receptors in animal development. *Nuclear Receptor Research*. 2017; 4: 1-41.
15. Bouley R, Ding D, Peng Z, Bastian M, Lastochkin, Song W, et al. Structure-Activity Relationship for the 4(3H) Quinazolinone Antibacterials. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016; 59(10): 5011–5021.
16. Boyhus LE, Danielsen M, Bengtson NS, Kunze MBA, Kubiak X, Sminia TJ, et al. Gs protein peptidomimetics as allosteric modulators of the b2-adrenergic receptor. *Royal Society of Chemistry*. 2018; 8: 2219-2228.
17. Brandão MGL, Paula-Souza J, Graef CFF, Scalón V, Santos ACP, Salimena MF, Monte-Mor RLM. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais. *Anais do XIV Seminário sobre a Economia mineira*, 2010.
18. Brel AK, Lisina SV, Budaeva Yu N. Derivatives of Hydroxybenzoic Acids and Their Salts: Synthesis and Pharmacological Activity. *Russian Journal of General Chemistry*. 2015; 85(2): 387-391.
19. Calado AMC, Ramos RAN, Cintra RJ, Alves LC, Tinucci-Costa M. Expressão da glicoproteína-p e MRP1 em tecidos de cães com leishmaniose visceral. *ARS Veterinaria*. 2014; 30(2): 71-76.
20. Calixto JB, Júnior Siqueira JM. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta Médica da Bahia*. 2008; 78 (1): 98-106.

21. Camargo TM, Alves MIF, Oliveira S J, Oshima-Franco Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2007; 39(2): 95-98.
22. Camargo ELRA, Zaccarelli-Magalhães J, Fukushima AR, Spinosa HS. Comportamento materno: uma revisão da inter-relação com a toxicologia do desenvolvimento em roedores. *Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento*. 2017; 17(1): 8-25.
23. Campanella LCA, Da Silva AC, Freygang J, Dal Magro DD. Efeito da suplementação de óleo de cártamo sobre o peso corporal, perfil lipídico, glicídico e antioxidante de ratos Wistar induzidos a obesidade. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2014;35(1):141-147.
24. Carvalho EB, Borges EL, Carlos LMB, Silva MAM, Magalhães SMM, Gomes FVBAF. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. *Revista brasileira de hematologia hemoterapia*. 2007; 29(2):149-152.
25. Cascão R, Rosário HS, Fonseca JE. Neutrophils: warriors and commanders in Imune mediated inflammatory diseases. *ACTA Reumatológica Portuguesa*. 2009; 34(2b):313-326.
26. Cave MC, Clair HB, Hardesty JE, Falkner KC, Feng W, Clark BJ. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica Biophysica Acta*. 2016; 1859(9): 1083–1099.
27. Cheng F, Li W, Zhou Y, Shen J, Wu Z, Liu G, et al. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012; 52(11): 3099-3105.
28. Chien CTH, Helfinger LR, Bostock MJ, Solt A, Tan YL, Nietlispach D. An Adaptable Phospholipid Membrane Mimetic System for Solution NMR Studies of Membrane Proteins. *Journal of the American Chemical Society*. 2017; 139(42): 14829–14832.
29. Clarivet B, Robin P, Pers YM, Ferreira R, Lebrun J, Jorgensen C, Hillaire-Buys D, Brés V, Faillie JL. Tocilizumab and mesenteric arterial thrombosis: drug-drug interaction with anticoagulants metabolized by CYP 450 and/or by P-glycoprotein. *European Journal of Clinical pharmacology*. 2016; 72(11):1413-1414.
30. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Willians & Wilkins. 1991; 739-788.

31. Coqueiro AY, Godois AM, Raizel R, Tirapegui J. Creatina como antioxidante em estados metabólicos envolvendo estresse oxidativo. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício*. 2017; 11(64): 128-137.
32. Dacie J, Lewis SM. Practical Haematology. 9^a. ed. London: Editora Churchill Livingstone, 2001.
33. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010; 74(2): 417–433.
34. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology*. 2012; 2012:645460.
35. De Azevedo. A toxicologia e o futuro. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*. 2010; 3(3): 4-17.
36. De Falco A, Cukierman DS, Hauser-Davies RA, Rey NA. Doença de alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Química Nova*. 2016; 39(1): 63-80.
37. De Groot L, Abalovich M, Alexander EK, Amino N, Barbour L, Cobin RH, et al. Management of Thyroid Dysfunction during Pregnancy and Postpartum: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2012; 97(8): 2543-2565.
38. De Oliveira M.H, Innocente, A.M, Pereira A.G, Dias D.O, De Oliveira E.G, Barreto F, et al. Semi-síntese: uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2012; 9 (1): 62 88.
39. De Souza J, Freitas ZMF, Storpirts S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007; 43(4): 514-527.
40. Do Nascimento ED. Resistência Bacteriana em Reservatórios do Semiárido Brasileiro: Caracterização, Ações para Vigilância Ambiental, Prevenção e Educação em Saúde. [Tese]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2016. 273p.
41. Dos Santos EC, Ferreira MA. A indústria farmacêutica e a introdução de medicamentos genéricos no mercado brasileiro. *Revista Nexos Econômicos*. 2012; 6(2): 95-120.

42. Dos Santos JAF. Avaliação de estudos pré-clínicos de análogos sintéticos do fenetil ester do ácido caféico com potencial antitumoral. [Monografia]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2015. 45p.
43. Dirar AI, Waddad AY, Mohamed MA, Mohamed MS, Osman WJ, Mohammed MS, et al. In silico pharmacokinetics and molecular docking of three leads isolated from *Tarconanthus camphoratus* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2016; 8(5): 71-77.
44. Duarte AE, Waczuk EP, Roversi K, da Silva MA, Barros LM, da Cunha FA. Polyphenolic Composition and Evaluation of Antioxidant Activity, Osmotic Fragility and Cytotoxic Effects of *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. *Molecules*. 2015; 21(2): 1-15.
45. Dumont JA, Loveday KS, Light DR, Pierce GF, Jiang H. Evaluation of the toxicology, pharmacokinetics, and local tolerance of recombinant factor IX Fc fusion protein in animals. *Thrombosis Research*. 2015; 136 (2): 371–378.
46. Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*. 2007; 152(1): 9–20.
47. El- Sayed S, Metwally K, El-Shanawani A A, Abdel-Aziz LM, Pratsini H, Kletsas D. Synthesis and anticancer activity of novel quinazolinone based rhodanines. *Chemistry Central Journal*. 2017; 11 (102): 1-10.
48. Ferreira V.F, Pinto A.C. A Fitoterapia No Mundo Atual. *Quimica Nova*. 2010; 33 (9): 1829.
49. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*. 2017; 10(4): 369—378.
50. Fukushima AR, De Azevedo FA. História da Toxicologia. Parte I – breve panorama brasileiro. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*. 2008; 1(1): 1-32.
51. Gastalho S, Da Silva GJ, Ramos F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 2014; 3(1): 27-41.
52. Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR. Methods for general and molecular bacteriology, Washington. *American Society for Microbiology*. 1994: 791.

53. Gertrudes JC, Maltarollo VG, Silva RA, Oliveira PR, Honório KM, Da Silva ABF. Machine Learning Techniques and Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*. 2012; 19(25): 4289-4297.
54. Golan DE, Tashjian Júnior AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2014.
55. González B, Colilla M, Díez J, Pedraza D, Guembe M, Izquierdo-Barba I, et al. Mesoporous Silica Nanoparticles Decorated with Polycationic Dendrimers for Infection Treatment. *Acta Biomaterialia*. 2018.
56. Ghosh A, Kanthasamy A, Joseph J, Anantharam V, Srivastava P, Dranka B, et al. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of an orally active apocynin derivative in pre-clinical models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*. 2012; 9:241.
57. Guimarães CC, Ferreira TC, De Oliveira RCF, Simioni PU, Ugrinovich LA. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Biociências*. 2017; 15(2): 83-89.
58. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. *Phytochemical Analyses*. 2000; 11(3): 137-147.
59. Harrison JF, Hollensworth SB, Spitz DR, Copeland WC, Wilson GL, LeDoux SP. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33(14): 4660-4671.
60. Hasan S, Albayaty YNS, Thierry B, Prestidge CA, Thomas N. Mechanistic studies of the antibiofilm activity and synergy with antibiotics of Isosorbide mononitrate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 115:50-56.
61. Hauser AS, Attwood MM, Raske-Andersen M, Schioth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Reviews*. 2017; 16: 829-842.
62. Hendra R, Ahmad S, Sukari A, Shukor MY, Oskoueian E. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. *International Journal of Molecular Science*. 2011; 12(6): 3422-3431.

63. Jafari E, Khajouei MR, Hassanzadeh F, Hakimelahi GH, Khodarahmi GA. Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures with potent antimicrobial and cytotoxic activities. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2016; 11(1): 1-14.
64. Jensen BB, Comandolli-Wyrepkowski CD, Barros AMC, Soares FV, Grafova I, Grafov A, et al. Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* de *Tanacetum vulgare* (Asteraceae). *Acta Brasiliensis*. 2017; 1(2): 33-37.
65. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hoyer BA. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*. 2010; 38(1): 96-109.
66. Lamothe SM, Li JGW, Yang T, Zhang S. The Human Ether-a-go-go-related Gene (hERG) Potassium Channel Represents an Unusual Target for Protease-mediated Damage. *Journal of Biological Chemistry*. 2016; 291(39): 20387-20401.
67. Leite DI, Faria JV, Azevedo LD, Figueiredo YV, Martins, WA, Bianco MCAD, et al. Tenofovir: Relação Estrutura-Atividade e Métodos de Síntese. *Revista Virtual de Química*. 2015; 7(6): 2347-2376.
68. Lima JPR, Cavalcanti Filho PF. Indústria farmacêutica: a evolução recente no Brasil e caso de Pernambuco. *Revista Brasileira de Estudos Regionais e Urbanos*. 2007; 1(1): 156-189.
69. Linardi VR, Coelho Neto NM, De Araújo PL, Da Silva EF. isolamento de *Staphylococcus aureus* MRSA entre os funcionários de um hospital geral da região leste de Minas Gerais. *Revista de Saúde Pública do SUS*. 2014; 2(2): 59-64.
70. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 46(1-3): 3-26.
71. Liu M, Xu Y, Han X, Liang C, Yin L, Xu L, et al. Potent Effects of Flavonoid-Rich Extract from *Rosa laevigata* Michx Fruit against Hydrogen Peroxide-Induced Damage in PC12 Cells via Attenuation of Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis. *Molecules*. 2014; 19: 11816-11832.
72. Livermore DM. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *Korean Association of Internal Medicine*. 2012; 27(2):128-142.

73. Mabkhot YN, Alatibi F, El-Sayed NNE, Al-Showiman S, Kheder NA, Wadood A, et al. Antimicrobial Activity of Some Novel Armed Thiophene Derivatives and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) Analyses. *Molecules*. 2016; 21(2): 1-16.
74. Machado LP, Kohayagawa A, Saito ME, Da Silveira VF, Yonezawa LA. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na Medicina Veterinária. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 2009; 8 (1): 84-94.
75. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl. *Microbiologia de Brock*. 14^a. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2016.
76. Manente FA, Mello LRA, Khalil OAK, De Carvalho CT, Bannach G, Velloso JCR. Efeito da complexação de metais aos antiinflamatórios na ação contra agentes oxidativos e radicais livres: ação do cetoprofeno. *Eclética Química*. 2011; 36(2): 107-127.
77. Mao XY, Jin MZ, Chen JF, Zhou HH, Jin WL. Live or let die: Neuroprotective and anti-cancer effects of nutraceutical antioxidants. *Pharmacology & Therapeutics*. 2017.
78. Marreiro RO, Bandeira MFCL, De Almeida MC, Coelho CN, Venâncio GN, Conde NCO. Avaliação da citotoxicidade de um enxaguatório bucal contendo extrato de Libidibia férrea. *Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic*. 2014; 14(Supl.3):34-42.
79. Martelli F, Nunes FMF. Radicais livres: Em busca do equilíbrio. *Ciência e Cultura*. 2014; 66(3): 54-57.
80. Mascarenhas Netto RC, Fabbri C, De Freitas MV, Bernardino Neto M, Garrote-Filho MS, Lacerda MVG, et al. Influence of Plasmodium vivax malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitology Research*. 2014; 113 (3):863–874.
81. Merino FJZ, Oliveira VB, Paula CS, Cansian FC, Souza AM, Zuchetto M. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2015; 17(4): 1031-1040.
82. Mohamed MA, Ghanem HM, Abd El-Ghaffar NF, Mohamed SS. Biological Evaluation and Molecular Docking of Substituted Quinazolinones as Antimicrobial Agents. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2013; 7(2): 263-274.

83. Mohamed MA, Dirar AI, Hamdoun S. Discovery of two diacetylene glycosides as human uridine-cytidine kinase 2 inhibitors: an *in silico* approach. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016; 6 (11): 34-39.
84. Molton JS, Tambyah PA, Ang BSP, Ling ML, Fisher DA. The Global Spread of Healthcare-Associated Multidrug-Resistant Bacteria: A Perspective From Asia. *Healthcare Epidemiology*. 2013;56(9):1310–1318.
85. Monteiro ACB, Dorigatti DH, Rodrigues AG, Da Silva JBM. Anemia falciforme, uma doença caracterizada pela alteração no formato das hemácias. *Revista Eletrônica Saúde em foco/ UNISEPE*. 2015; 07:107-118.
86. Motta A.O, Lima D.C.S, Vale, C.R. Levantamento do uso de plantas medicinais em um centro de educação infantil em Goiânia – GO. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*. 2016; 14 (1):629-646.
87. Motti PR, Porto KRA, Roel AR. Toxicidade da formulação obtida a partir do líquido da castanha do caju *Anacardium occidentale* L. em *Artemia salina* Leach. *Multitemas*. 2015; 47:9-19.
88. Moura WCS, Lima ZN, Mendonça Júnio FJB, De Moura R.O. Desenvolvimento através da síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de derivados 2-amino-tiofênicos-substituídos como potenciais fármacos antifúngicos. *Revista de Biologia & Farmácia e Manejo Agrícola*. 2014; 10 (2): 17-25.
89. Mueller D, Jung K, Winter M, Rogoll D, Melcher R, Kulozik U. Encapsulation of anthocyanins from bilberries – Effects on bioavailability and intestinal accessibility in humans. *Food Chemistry*. 2018; 248: 217–224.
90. Muñoz-Vahos C, García- Jiménez E, Villa-Palacio MI. Enfermedades relacionadas con el grupo sanguíneo ABO. *Hechos Microbiológicos*. 2012; 3(2): 59-69.
91. Nardid O, Repina S, Rozanova E, Cherkashina Y, Nardid E. Properties of aqueous-saline human placental extracts and their fractions after storage of placenta at various subzero temperatures. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 2015; 5(4): 172-177.

92. Nehme H, Saulnier P, Ramadan AA, Cassisa V, Guillet C, Eveillard M, et al. Antibacterial activity of antipsychotic agents, their association with lipid nanocapsules and its impact on the properties of the nanocarriers and on antibacterial activity. *Plos One*. 2018; 13(1): 1-18.
93. Nelson LJ, Morgan K, Treskes P, Samuel K, Henderson CJ, LeBled C, et al. Human Hepatic HepaRG Cells Maintain an Organotypic Phenotype with High Intrinsic CYP450 Activity/Metabolism and Significantly Outperform Standard HepG2/C3A Cells for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2017; 120(1): 30-37.
94. Nicco C, Batteux F. ROS Modulator Molecules with Therapeutic Potential in Cancers Treatments. *Molecules*. 2018; 23(1): 1-16.
95. Nigra AD, Monesterolo NE, Rivelli JF, Amaiden MR, Campetelli AN, Casale CH. Alterations of hemorheological parameters and tubulin content in erythrocytes from diabetic subjects. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016; 74: 109-120.
96. Nunes GBL, Policarpo PR, Costa LM, Da Silva TG, Militão GCG, Câmara CA, et al. *In Vitro* Antioxidant and Cytotoxic Activity of Some Synthetic Riparin-Derived Compounds. *Molecules* 2014, 19:4595-4607.
97. Olander M, Wisniewski JR, Matsson P, Lundquist P, Artursson P. The Proteome of Filter-Grown Caco-2 Cells With a Focus on Proteins Involved in Drug Disposition. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 105: 817-827.
98. Oliveira S, Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane. *Journal Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2010; 44 (1): 63-74.
99. Oliveira VB, Zuchetto M, Paula CS, Verdam MCS, Campos R, Duarte AFS. Avaliação do potencial antioxidante frente à oxidação lipídica e da toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das frondes de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas*. 2015; 17(4): 614-621.
100. Paiva SG, Sabino AP, Carvalho MG, Ribeiro DD, Gomes KB, Santos MS, et al. Polymorphisms in exons 6 and 7 of the ABO locus and their association with venous thrombosis in young Brazilian patients. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2009; 20(2): 122-128.

101. Pándy-Szekeres G, Munk C, Tsonkov TM, Mordalski S, Harpsoe K, Hauser AS, et al. GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Research*. 2018; 4: 440-446.
102. Paramashivam SK, Elayaperumal K, Natarajan BB, Ramamoorthy MD, Balasubramanian S, Dhiraviam KN. *In silico* pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from *Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases. *Bioinformation*. 2015; 11(2): 73-84.
103. Peng LP, Nagarajan S, Rasheed S, Zhou CH. Synthesis and biological evaluation of a new class of quinazolinone azoles as potential antimicrobial agents and their interactions with calf thymus DNA and human serum albumin. *Medicinal Chemistry Commun*. 2015; 6: 222–229.
104. Pereira VSS, De Oliveira CBS, Fumagalli F, Emery FS, Da Silva NB, Andrade-Neto VF. Cytotoxicity, hemolysis and in vivo acute toxicity of 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinone derivatives. *Toxicology Reports*. 2016; 3: 756-762.
105. Pinto AC, Barreiro EJ. Desafios da indústria farmacêutica brasileira. *Química Nova*. 2013; 36(10): 1557-1560.
106. Pitondo-Silva A, Martins VV, Fernandes AF, Stehling EG. High level of resistance to Aztreonam and Ticarcillin in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soil of different crops in Brazil. *Science of the Total Environment*. 2014; 473-474: 155-158.
107. Prokof'eva NG, Utkina NK, Chaikina EL, Makarchenko AE. Biological activities of marine sesquiterpenoidquinones: structure-activity relationships in cytotoxic and hemolytic assays. *Physiology of Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 2004; 139: 169-173.
108. Rangel M, Malpezzi ELA, Susini SMM, Freitas JC. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon*. 1997; 35(2): 305-309.
109. Rask-Andersen M, Masuram S, Schiöth H B. The druggable genome: evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*. 2014; 54: 9–26.
110. Reis AMM, Pedroso LA, Costa SC, De Figueiredo TP. Medicamentos utilizados por idosos no domicílio que atuam como substratos ou moduladores da Glicoproteína P. *Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde*. 2015; 6(1): 30-36.

111. Reis FMP, Barbosa FT, Ramos FWS. Beta-Talassemia Menor e o risco de aterosclerose: o papel do estresse oxidativo eritrocitário e dos níveis de paraoxonase-1 como fatores agravantes. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2017; 49(1): 10-17.
112. Ribeiro RS, Afonso C, Castro PML, Tiritan ME. Fármacos quirais em diferentes matrizes ambientais: ocorrência, remoção e toxicidade. *Química Nova*. 2016; 39(5): 598-607.
113. Ribeiro, TPP. Estudo teórico (modelagem molecular e QSAR) de compostos quinolínicos com atividade herbicida. [Dissertação]. Cascavel-Paraná: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2017.
114. Rodi PM, Gianello MDB, Corregido MC, Gennaro AM. Comparative study of the interaction of CHAPS and Triton X-100 with the erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1838 (3): 859–866.
115. Rodrigues JAR. Nomenclatura de Compostos Orgânicos Segundo as Recomendações da IUPAC. Uma Breve Introdução. *CHEMKEYS*. 2011: 1-11.
116. Rodrigues RP, Mantoani SP, De Almeida JR, Pinsetta F R, Semighini EP, Da Silva VB, et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. *Revista Virtual de Química*. 2012; 4(6): 739-776.
117. Romero PJ. Hernández-Chinea C. The Action of Red Cell Calcium Ions on Human Erythrophagocytosis in Vitro. *Frontiers in physiology*. 2017; 8:1008.
118. Rostami A, Pourshiani O, Navasi Y, Darvishi N, Saadati S. Magnetic nanoparticle-supported DABCO tribromide: a versatile nanocatalyst for the synthesis of quinazolinones and benzimidazoles and protection/deprotection of hydroxyl groups. *New Journal of Chemistry*. 2017; 41(17): 9033-9040.
119. Sachan A.K, Gupta A. A review on nanotized herbal drugs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015; 6 (3): 961-970.
120. Santos MCBG, Pinho M. Estratégias tecnológicas em transformação: um estudo da indústria farmacêutica brasileira. *Gestão & Produção*. 2012; 19(2): 405-418.

121. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*. 2017; 11: 613-619.
122. Silva DA. *Screening* de produtos naturais com potencialidade para tratamento de doenças ocasionadas por *Helicobacter pylori*: um estudo *in vitro* e *in silico*. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Campo Mourão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2015. 108p.
123. Singh VK. Synthesis and bioactivity of fused 4-(3h) quinazolinone derivatives. *International Journal of Science Technology*. 2015; 4(1): 484-487.
124. Sinkalu VO, Ayo JO, Abimbola AA, Ibrahim JE. Effects of melatonin on cloacal temperature and erythrocyte osmotic fragility in layer hens during the hot-dry season. *Journal of Applied Animal Research*. 2015; 43(1): 52-60.
125. Smith, C, Marks AD, Lieberman M. Bioquímica Médica Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica. 2ª.ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2007.
126. Soares ER, Monteiro EB, Da Silva RC, Batista A, Sobreira F, Mattos T, et al. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. *Revista HUPE, Rio de Janeiro*. 2015;14(3):64-72.
127. Solcia MC, Fregonezi NF, De Souza FA, Resende FA, Fernandes GFS, De Souza PC, et al. CS. Ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* para avaliação da atividade mutagênica de compostos furoxanos com potencial aplicação contra *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2016; 37.
128. Souza JPA. Síntese e estudo de *docking* molecular e Qsar de derivados do ácido cinâmico como potenciais inibidores de HIV-1 protease. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Campo Mourão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2015. 90p.
129. Srimai V, Ramesh M, Parameshwar KS, Parthasarathy T. Computer-aided design of selective cytochrome P450 inhibitors and docking studies of alkylresorcinol derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 2013; 22:5314-5323.
130. Suganthi N, Muniasamy S, Archunan G. Safety assessment of methanolic extract of *Terminalia chebula* fruit, *Terminalia arjuna* bark and its bioactive constituent 7-methyl gallic acid: In vitro and in

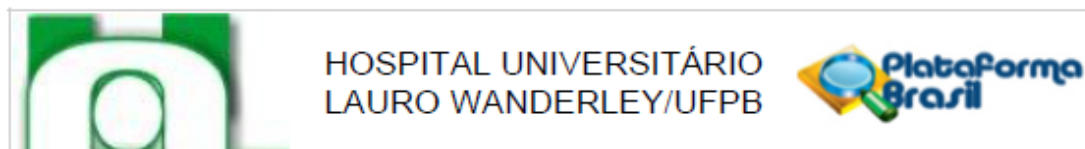
- vivo studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018; 92: 347–357.
131. Sumathi S, Anuradha R. *In vitro* anti-inflammatory activity of flower extract of *Couroupita guianensis* Aubl. *International Journal of Herbal Medicine*. 2016; 4(5):5-8.
 132. Talukdar P, Ganguly D, Mandal S. Assessment of bio-larvicide for *Culex epidesmus* through bioassay along with toxicokinetics and virtual screening of phytoligands from the leaf of *Azadirachta indica* against mosquito acetylcholinesterase. *International Journal of Advanced Research in Computer Science*. 2017; 8(5): 445-451.
 133. Tariq M, Sirajuddin M, Ali S, Khalid N, Tahir MN, Khan H, et al. Pharmacological investigations and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) analyses of newly synthesized potentially bioactive organotin (IV) carboxylates. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2016; 158:174–183.
 134. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10^a ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2012.
 135. Uddin N, Sirajuddin M, Uddin N, Tariq M, Ullah H, Ali S, Tirmizi SA, Khan AR. Synthesis, spectroscopic characterization, biological screenings, DNA binding study and POM analyses of transition metal carboxylates. *Spectrochim. Acta A*. 2015; 140: 563–574.
 136. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuca K, Musílek K. Redox[±] and non[±]redox metal induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*. 2016; 90(1): 1–37.
 137. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002; 45(12): 2615-2623.
 138. Victal JC, Valério LB, Oshiro MC, Baptista SC, Pinheiro F. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*. 2014; 7(2): 36-57.
 139. Vieira GC. Modelagem molecular e Imunodeteção de DNA metiltransferases 2 de Drosofilídeos: Uma abordagem evolutiva da Enigmática DNMT2. [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2015.

140. Vijayakumar K, Ahamed AJ, Thiruneelakandan G. Synthesis, Antimicrobial, and Anti-HIV1 Activity of Quinazoline-4(3H)-one Derivatives. *Journal of Applied Chemistry*. 2013; 1-5.
141. Voet D, Voet JG. Bioquímica. 4ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2013.
142. United States Environmental Protection Agency. 2018. Computational Toxicology Research. Disponível em: <<https://www.epa.gov/aboutepa/about-national-center-computational-toxicology-ncct>>. Acesso em: 10 jan. 2018.
143. Vega-Rodríguez J, Pastrana-Mena R, Crespo-Lladó KN, Ortiz JG, Ferrer-Rodríguez I, Serrano AE. Implications of Glutathione Levels in the Plasmodium berghei Response to Chloroquine and Artemisinin. *PLOS ONE*. 2015; 10(5): 1-15.
144. Wadhwa S, Singhal S, Rawat S. Bioavailability Enhancement by Piperine: A Review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2014; 4(36): 1-8.
145. Wypij M, Czarnecka J, Swiecimska M, Dahma H, Rai M, Golinska P. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2018; 34(2): 23.
146. Yasmeeen H, Hassnain S. Comparative Analysis of Different Bioactivities of Curcuma longa, Nigella sativa Seeds, and Camellia sinensis Extracted by Four Different Methods: A Green Way to Reduce Oxidative Stress. *Food Science Biotechnology*. 2016; 25(3): 811-819.
147. Yu Y, Cui Y, Niedernhofer LJ, Wang J. Occurrence, Biological Consequences, and Human Health Relevance of Oxidative Stress-Induced DNA Damage. *Chemical Research in Toxicology*. 2016; 29(12): 2008-2039. (b)
148. Zayed MF, Hassan MH. Synthesis and biological evaluation studies of novel quinazolinone derivatives as antibacterial and anti-inflammatory agents. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2014; 22: 157-162.
149. Zohra M, Fawzia A. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 2014; 5(8): 495-500.

Anexos

ANEXOS

Anexo A: Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E TOXICIDADE

Pesquisador: Andressa Brito Lira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56343216.6.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.658.669

Informamos que qualquer alteração no projeto, dificuldades, assim como os eventos adversos deverão ser comunicados a este Comitê de Ética em Pesquisa através do Pesquisador responsável uma vez que, após aprovação da pesquisa o CEP-HULW torna-se co-responsável.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_721929.pdf	06/07/2016 17:16:01		Aceito
Outros	CertidaoaprovaCEUA.pdf	06/07/2016 17:13:56	Andressa Brito Lira	Aceito
Outros	CartaanuenciaLABETOX.pdf	06/07/2016 17:11:42	Andressa Brito Lira	Aceito
Outros	Cartaresposta.pdf	06/07/2016 17:08:31	Andressa Brito Lira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetov.pdf	06/07/2016 17:05:20	Andressa Brito Lira	Aceito
Outros	Declaracao.JPG	20/05/2016 17:07:36	Andressa Brito Lira	Aceito
Outros	formulario.pdf	20/05/2016 17:05:53	Andressa Brito Lira	Aceito
Outros	Unidadetransfusional.pdf	20/05/2016 17:04:56	Andressa Brito Lira	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	20/05/2016 17:01:19	Andressa Brito Lira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não